

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA HUMANA

UNIDAD DE POSTGRADO

**Alteraciones citogenéticas en leucemia mieloide aguda
M2 (FAB) en adultos y su correlación con
inmunofenotipo y morfología**

TESIS

para optar el grado académico de Magíster en Bioquímica

AUTOR

Yesica Llimpe Mitma

ASESOR

Duber Odilón Gallardo Vallejo

Doris Virginia Huerta Canales

Lima – Perú

2007

Asesor:

Mg. Duber Odilón Gallardo Vallejo

Co asesora:

Mg. Doris Virginia Huerta Canales

DEDICATORIA

A mi esposo H. Jaime
a quien amo y respeto

A mis padres
Emiliano y Alberta
A mis hermanos Rafael,
y John Phaul

AGRADECIMIENTOS

A todos los que han contribuido a la realización de este estudio, de manera muy especial:

A la Dra. Raquel Oré Sifuentes, coordinadora de la Maestría en Bioquímica de la Facultad de Medicina y ex Directora del Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición “Alberto Guzmán Barrón” UNMSM, por el permanente apoyo académico y asesoría.

A la Dra. Doris Huerta Canales, miembro del Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición “Alberto Guzmán Barrón” UNMSM, por la permanente ayuda académica, asesoría y valiosos consejos.

A todos mis colegas del Departamento de Ciencias Dinámicas de la UNMSM.

A mi Asesor, Dr. Duber Gallardo Vallejo, por su asesoría.

A todos los miembros de la Unidad de Genética y Biología Molecular del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas, en especial al Dr. Abelardo Arias Velásquez.

A la Sra. Maritza Ramírez Monteverde del Servicio de Estadística del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas, por su apoyo en la prestación de historias clínicas.

Al Sr. Raúl Mantilla Quispe, del Instituto de Investigación y Docencia Maes Heller por su ayuda brindada en el procesamiento de datos.

Al Biólogo Ramón Espinoza Lewis, compañero de la base 96, egresado de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM, por su valiosa ayuda en la obtención de algunos artículos científicos para esta tesis.

A los miembros de los laboratorios de Hematología Especial y Citometría de Flujo, y a todos aquellos miembros del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas que con su trabajo y esfuerzo diario logran brindar ayuda a los pacientes con cáncer.

ABREVIATURAS Y NOMENCLATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

cc: Centímetro cúbico

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato

DE: Doble estirpe

EDTA: Ácido etilen diamino tetra acético

EMR: Enfermedad mínima residual

FAB: Franco Americano Británica

FISH: Hibridización *in situ* con fluorescencia

g%: Gramos por ciento (g en 100 mL de solución)

GTG: (Bandas G-Tripsina-Giemsa), técnica de bandeado con tripsina y tinción con Giemsa

INEN: Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas

K: Índice Kappa

ISCN: International System for Human Cytogenetic Nomenclature

KCl: Cloruro de potasio

LA: Leucemia aguda

LDH: Lactato deshidrogenasa

LLA: Leucemia linfática aguda

LMA: Leucemia mieloide aguda

LMC: Leucemia mieloide crónica

M: Molar

mar: Cromosoma marcador

mL: Mililitros

mM: Milimolar

n: Índice de refracción

NaCl: Cloruro de sodio

NP-40: Nonidet P40

OMS: Organización Mundial de la Salud

del(9q): Deleción del brazo largo del cromosoma 9

der(8): Cromosoma derivado del 8

der(21): Cromosoma derivado del 21

Dx: Diagnóstico

PBS: Buffer fosfato Salino

PT: Parcialmente tratada

Q.P.: Químicamente Puro

rpm: Revoluciones por minuto

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa previa transcripción
reversa

SMD: Síndrome mielodisplásico

SSC: Solución Citrato Salino

t(8;21): Translocación entre los cromosomas 8 y 21

uL: Microlitros

ug: Microgramos

U/L: Unidades por litro

8q22: Banda 2, región 2, del cromosoma 8

GLOSARIO

Bastones de Auer: Inclusiones celulares aciculares pequeñas, originadas por la acumulación de gránulos anómalos.

Blastos: Células inmaduras que darán origen a una o varias líneas celulares.

Citometría de Flujo: Técnica de análisis que mide ciertas características físicas y químicas de las células al pasar, una a una, por un rayo de luz.

Citoquímica: Técnica que estudia la composición química de las células y permite detectar la localización topográfica de algunos de sus componentes.

Críptico: No detectable mediante citogenética convencional.

Cromosoma marcador: Cromosoma cuyo origen o rearreglo no se puede determinar.

Cromosoma derivado: Cromosoma rearreglado, producto de una (varias) alteración(es) cromosómica(s).

Delección: Pérdida de material cromosómico.

Doble estirpe: 2 líneas celulares o de diferenciación diferentes.

Duplicación: Aumento de material cromosómico que se coloca adyacente al segmento copiado.

Envejecer: Mantener, por un determinado tiempo, las láminas con las muestras fijadas, sin ser sometidas al bandeo cromosómico.

Gen quimérico: Gen producto de la fusión de 2 genes diferentes.

HLA-DR: Tipo de antígeno leucocitario humano de clase II.

Inmunofenotipo: Identificación y cuantificación de distintas poblaciones celulares en base a la expresión diferencial de marcadores de membrana.

Interfase: Fase en la cual la célula no se encuentra en división.

Inversión: Alteración estructural de un cromosoma que implica la ruptura de un segmento cromosómico y su posterior fusión pero en posición invertida.

Isocromosoma: Cromosoma cuyos brazos corto (p) y largo (q) son iguales.

Genotoxina: Sustancia que daña el material genético de las células.

Hiperdiploidías: Metafases con más de 46 cromosomas normales.

Hipodiploidías: Metafases con menos de 46 cromosomas normales.

Locus: Posición que tiene cada gen en el cromosoma.

Metafase: Fase de la mitosis en la cual los cromosomas alcanzan su máxima condensación.

Mieloperoxidasa: Peroxidasa presente en la línea leucocitaria mieloide.

Monosomía: Presencia de un solo cromosoma de un par cromosómico, por pérdida de uno de ellos.

Nervy: Gen de *Drosophila melanogaster*, homólogo al gen *ETO* en humanos.

Remisión: Cuando los signos y síntomas sugieren ausencia de actividad neoplásica, verificada por citogenética convencional, molecular u otras.

Subclonas: Población celular derivada de otra.

Stem cell: Célula madre o célula troncal que dará origen a varias líneas celulares.

Translocación: Intercambio de material cromosómico entre cromosomas no homólogos.

CONTENIDO

	Pág.
▪ Resumen	1
▪ Abstract	2
▪ Introducción	3
▪ Antecedentes	8
▪ Materiales y métodos	14
▪ Resultados	21
▪ Discusión	43
▪ Conclusiones	45
▪ Recomendaciones	46
▪ Bibliografía	47

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue caracterizar las alteraciones citogenéticas encontradas en muestras de médula ósea de pacientes adultos diagnosticados como Leucemia Mieloide Aguda subtipo M2 (FAB), por medio de la Citogenética Convencional y Molecular, y evaluar su concordancia con los resultados obtenidos mediante el Inmunofenotipo y Morfología. Se trabajó con 28 muestras, tomadas a un grupo de pacientes que tuvieron diagnóstico definitivo de LMA subtipo M2, desde enero del 2004 a diciembre del 2005. 20 casos presentaron metafases analizables mediante la citogenética convencional (Bandas G), siendo 9 (45%) positivos para la translocación t(8;21) ó sus variantes. 11 muestras de un grupo de pacientes con diagnóstico de LMA subtipo M2, fueron analizadas mediante el análisis citogenético molecular (FISH locus específico), siendo 5 casos (46%) positivos para la presencia del gen de fusión *AML1/ETO* producto de la translocación t(8;21). La sensibilidad de detección de la translocación t(8;21) aumenta cuando se usa, además de técnicas convencionales, como el análisis del cariotipo, técnicas de mayor sensibilidad y especificidad como el FISH. La correlación encontrada entre los resultados mediante la citogenética y el inmunofenotipo y morfología mediante el índice Kappa fue insignificante (0.151), considerando sólo la presencia de la translocación t(8;21) como principal anomalía cromosómica encontrada en la LMA M2. Sin embargo se debe tener en cuenta que esta alteración no es exclusiva ni la única que se puede encontrar de este tipo de enfermedad y, que podría encontrarse otras alteraciones cromosómicas e incluso cariotipos normales.

ABSTRACT

The objective of this research was to characterise the cytogenetic alterations found in samples of bone marrow of adult patients with clinical diagnosis of subtype M2 Acute Myeloid Leukemia (FAB), using both conventional and molecular cytogenetic; and to evaluate the agreement with the results obtained by immunophenotype and morphology assays. This research was performed with 28 samples of bone marrow, which were taken from a group of patients with diagnosis of subtype M2 AML from January 2004 to December 2005. 20 cases were showed analyzable metaphases through conventional cytogenetic (Banding G), being 9 positive cases (45%) for t(8;21) translocation or its variants. The molecular cytogenetic analysis (FISH specific locus), was performed in 11 samples of the a group of patients with diagnosis of M2 AML, 5 cases (46%) were positive for *AML1/ETO* fusion gene product of t(8;21) translocation. The sensitivity of the detection of t(8;21) translocation is increased by using more sensitive and specific tests like FISH added to conventional procedures. The agreement found between the results of the cytogenetic and immuno phenotype and morphology assay was insignificant by kappa index (0.151), considering only the presence of t(8;21) translocation as the main chromosomal anomaly found in AML M2. It must be take in account that this finding is not exclusive, neither unique for this kind of disease; it could be found also another chromosomal alterations or even normal karyotypes.

INTRODUCCIÓN

La leucemia es una enfermedad que involucra la alteración de la hematopoyesis normal (Gilliland, 2002) (Fig.1), caracterizada por la proliferación neoplásica de las células precursoras hematopoyéticas (Acevedo, 1993). Etimológicamente, la palabra leucemia, proviene de dos raíces griegas: *leuco* y *emia*, que significan “blanco” y “sangre”, respectivamente.

Las leucemias, de acuerdo a su progresión, pueden ser agudas o crónicas. La Leucemia aguda (LA) es una enfermedad extendida mundialmente, cuya incidencia reporta de 5 - 6 casos por 100 000 habitantes por año (Romero y col., 2002). Puede ser de linaje linfóide o mieloide; la Leucemia Linfática Aguda (LLA) predomina en la niñez y, entre los adultos, predomina la Leucemia Mieloide Aguda (LMA).

La LMA es una enfermedad heterogénea (Downing, 1999; Mrózek y col., 2001), con casos individuales que muestran variabilidad en la presentación clínica, morfología de los blastos, respuesta terapéutica y pronóstico (Downing, 1999). Corresponde a un grupo de neoplasias malignas de médula ósea que se caracteriza por la excesiva acumulación de células precursoras mieloides en médula ósea, en sangre periférica y a veces también, en otros tejidos. La incidencia total de la LMA en todas las edades es de 2.5 por 100 000 por año y aumenta después de los 55-60 años de edad, siendo los varones ligeramente más afectados que las mujeres (Heim y col., 1995).

Un grupo de estudio cooperativo Franco-Americano-Británico (FAB) en 1976 propuso un conjunto de criterios que han sido ampliamente aceptados en la clasificación de las LMA, presentándose los siguientes subtipos:

1. Leucemia mieloide aguda con mínima evidencia de diferenciación mieloide. Subtipo M0
2. Leucemia mieloide sin maduración. Subtipo M1
3. Leucemia mieloide aguda con maduración. Subtipo M2
4. Leucemia promielocítica aguda. Subtipo M3
5. Leucemia aguda mielomonocítica. Subtipo M4

6. Leucemia monocítica aguda. Subtipo M5
7. Leucemia eritroblástica aguda. Subtipo M6
8. Leucemia megacarioblástica aguda. Subtipo M7

Siendo la más frecuente la LMA M2 y comprende el 30-45% de casos de LMA, y se define por más del 30% (Clasificación FAB) de mieloblastos en un aspirado de médula ósea determinado por la morfología e inmunofenotipo (Verschuur, 2004). Esta enfermedad se presenta en todas las edades: 40% tienen 60 ó más años y el 20% son menores de 25 años de edad (Brunning, 1994).

Los estudios realizados mediante la citogenética convencional ayudan a clasificar los desórdenes hematológicos asociados con alteraciones cromosómicas específicas. Las alteraciones citogenéticas adquiridas son marcadores tumorales de importancia en el diagnóstico y pronóstico. La observación de subclonas citogenéticas proporciona claves para evaluar la progresión de la enfermedad, la efectividad del tratamiento y monitorear la remisión.

En la LMA, las alteraciones citogenéticas son los factores pronósticos más importantes porque predicen la respuesta al tratamiento (Taub y col., 1999; Rojas y col., 2000). Las alteraciones cromosómicas recurrentes se han correlacionado con parámetros hematológicos y morfológicos que son, ahora usados, por la Clasificación de malignidades hematológicas de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Toogeh y col., 2003) para categorizar la LMA. La clasificación de la OMS incluye muchos de los criterios de clasificación del Grupo Cooperativo FAB, así como características morfológicas, citoquímicas y de inmunofenotipo, para establecer el linaje y el grado de maduración de las células neoplásicas (Vardiman y col., 2002).

Las alteraciones cromosómicas generalmente son clasificadas como numéricas o estructurales. Las alteraciones estructurales pueden ser: translocaciones, deleciones, inversiones, duplicaciones, isocromosomas, etc. siendo las translocaciones de tipo recíprocas, las más comunes en los desórdenes hematológicos.

Pacientes con LMA M2, presentan al examen de médula ósea, 30 - 90% de blastos, bastones de Auer en el 60 - 70% de casos (pudiéndose

encontrar uno o más). Los blastos son positivos para los marcadores de inmunofenotipo: HLA-DR, CD11, CD13, CD14, CD33 y negativos para CD41 y CD61. Se ha reportado que, aproximadamente el 20-25% de casos de LMA M2, están asociados con la translocación entre los cromosomas 8 y 21 (t(8;21)). En ellos, los blastos pueden contener numerosos gránulos, bastones de Auer frecuentemente delgados y elongados (Brunnig y col., 1994), intensa positividad a la mieloperoxidasa, vacuolización citoplasmática y prominente eosinofilia. Además, frecuentemente tienen un inmunofenotipo distintivo, caracterizado por positividad al marcador asociado a células B: CD19, así como a CD13, CD34 y CD56. Más del 90% de leucemias que presentan la t(8;21) presentan la morfología de LMA M2 FAB (Downing, 1999).

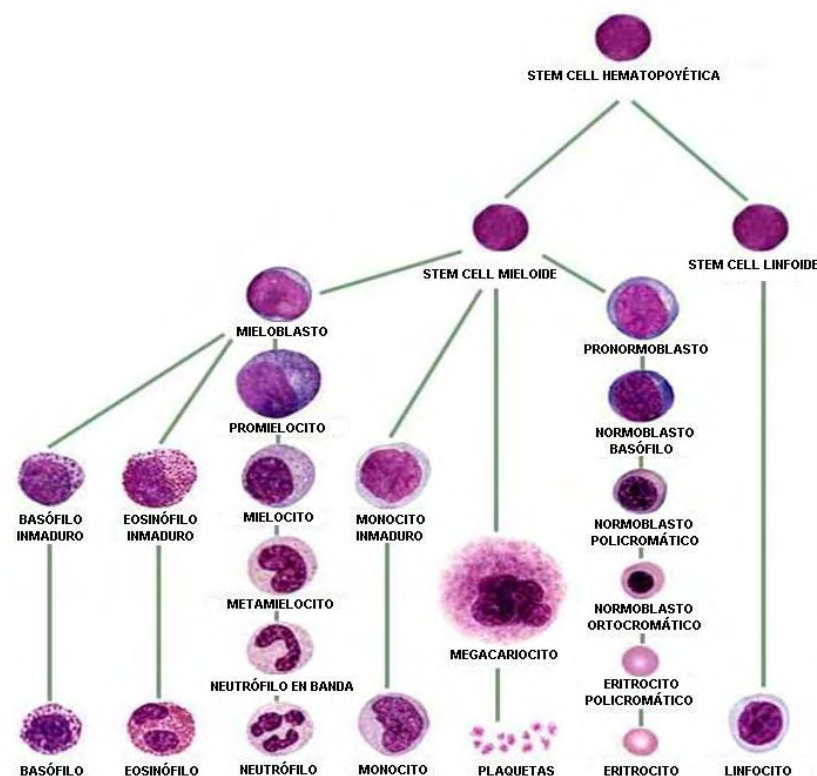
La t(8;21) es la alteración cromosómica más frecuente en la LMA, y representa el 30 - 40% de anomalías de la LMA M2 (Downing, 1999), entre cariotipos normales y otras alteraciones cromosómicas.

En las translocaciones ocurre un intercambio de material cromosómico entre cromosomas no homólogos. En el caso de la t(8;21), como producto de este rearrreglo, se genera el gen de fusión *AML1/ETO*, el cual está asociado con buen pronóstico (Cho y col., 2003; Staudt, 2003; Kaushal y col., 2001). Las translocaciones cromosómicas, asociadas con la LMA, generalmente involucran reguladores de la transcripción, los cuales, dan origen a genes híbridos que codifican proteínas de fusión con funciones alteradas. Esos factores de transcripción anormales, activados en subtipos específicos de LMA, eligen estados definidos de diferenciación mieloide, sugiriendo que interfieren con las redes esenciales en los diferentes estados de hematopoyesis.

La t(8;21) puede detectarse utilizando técnicas de citogenética convencional, como el bandeo cromosómico; técnicas de citogenética molecular, como la hibridización *in situ* con fluorescencia (FISH); Southern Blot; así como RT-PCR. La citogenética convencional, con el uso del bandeo cromosómico, permite identificar los cromosomas derivados producto de la t(8;21): cromosoma derivado del 8 (der(8)) y cromosoma derivado del 21 (der(21)), mediante el cultivo de la médula ósea del paciente, cosecha de la muestra, bandeo cromosómico y tinción, seguido del análisis de cada uno de

los cromosomas presentes en las células en metafase. La técnica de FISH permite identificar el gen de fusión *AML1/ETO*, producto de la t(8;21), pudiéndose analizar un gran número de células proliferantes (metafases) y no proliferantes (núcleos interfásicos), y es más sensible y útil para establecer el porcentaje de células neoplásicas antes y después de la terapia, es decir, se puede realizar un seguimiento de la enfermedad mínima residual (EMR) (Romero y col., 2002; Teixeira, 2002). La técnica de FISH detecta secuencias presentes normalmente en una sola copia en el genoma haploide y confirma rearrreglos específicos que pueden estar enmascarados en cambios cromosómicos crípticos o complejos (Teixeira, 2002). FISH con el uso de sondas locus específico, aumenta la sensibilidad de detección de alteraciones cromosómicas en pacientes con desórdenes hematológicos malignos ya que usa sondas de ADN específicas para la detección de una alteración determinada.

FIGURA 1: DIAGRAMA DE LA DIFERENCIACIÓN CELULAR HEMATOPOYÉTICA



Fuente: Internet

El Instituto Nacional de enfermedades neoplásicas (INEN), es un instituto dedicado exclusivamente al diagnóstico, cuidado, tratamiento y observación del paciente con cáncer. En el caso de neoplasias hematológicas como las leucemias, para dar el diagnóstico, se requiere de la evaluación clínica y exámenes de laboratorio que incluyen el estudio morfológico, de inmunofenotipo y citogenético de la médula ósea de los pacientes. En el Laboratorio de Hematología Especial, se realiza el estudio morfológico, citológico y citoquímico de la médula ósea. El estudio citológico establece el diagnóstico de LA si la blastosis es superior al 20%. El estudio citoquímico, determina la diferencia entre LLA y LMA mediante la identificación de peroxidasas y esterasas inespecíficas (Romero y col., 2002). En el Laboratorio de Citometría de Flujo se realiza el estudio del inmunofenotipo, que permite distinguir entre las LLA y LMA, en casos de que la citoquímica no sea concluyente (Romero y col., 2002). En la Unidad de Genética y Biología Molecular se realiza el estudio citogenético convencional y molecular de la médula ósea. El estudio citogenético convencional se realiza mediante al análisis cromosómico de las metafases sometidas a la técnica GTG (Bandas G); y el análisis citogenético molecular, se realiza mediante la técnica FISH locus específico. Tanto el estudio morfológico, de inmunofenotipo, citogenético y la evaluación clínica se complementan, y son empleados para dar el diagnóstico definitivo del paciente. De allí la importancia de la detección de las alteraciones cromosómicas, ya que de ello dependerá el diagnóstico, tratamiento y pronóstico. La identificación y caracterización de los genes rearrreglados por translocaciones en la LMA ha proporcionado nuevas perspectivas sobre los mecanismos de leucemogénesis y facilitarán el diseño de nuevas estrategias terapéuticas (Mrózek y col., 2000).

ANTECEDENTES

El análisis citogenético de células tumorales ha revelado la presencia de alteraciones cromosómicas en más de 30 000 neoplasias humanas. Desde la observación en los años 60 por Nowell y Hungerford de la aparición de un pequeño cromosoma, al que denominaron Philadelphia (Ph), en pacientes con Leucemia Mieloide Crónica (LMC), y la posterior descripción en los años 70 de técnicas de bandeo cromosómico, el análisis citogenético ha sido una de las áreas de la genética que se ha desarrollado con más rapidez (Calasanz, 2001).

Kamada en 1968 describió una translocación de dos cromosomas de los grupos C y G. Cuando los métodos de bandeo estuvieron disponibles, se dedujo que el rearrreglo implicaba los cromosomas 8 y 21, con puntos de corte en 8q22 y 21q22, siendo el más común en los casos de LMA subtipo M2. Sólo en casos ocasionales de leucemias con esta anormalidad, han sido clasificadas como M1 ó M4 (Andrieu y col., 1996).

La translocación entre los cromosomas 8 y 21, es una de las primeras en ser descrita como un cambio específico en LMA. Su presencia parece ser más frecuente en jóvenes y, menor en personas que pasan los 50 años de edad. Es la alteración citogenética más común en niños con LMA y en todas las LMA (Berger, 1982; Downing, 1999) en general. Está presente en alrededor del 15% (Downing, 1999; Lasa y col., 2002) o incluso 25% (Brunner y col., 1994) de todos los casos clasificados como LMA por FAB y 40% de todos los casos de LMA M2. En el 15% de casos LMA M2 se ha encontrado la t(8;21) como única anomalía.

Las frecuencias reportadas de la t(8;21) difieren entre diferentes partes del mundo, desde 12% en el noreste de los EEUU a 74% en China. Esto puede reflejar diferencias en los procedimientos en diferentes centros de investigación, pero no se puede excluir la posibilidad de algunos factores biológicos, por ejemplo, diferentes susceptibilidad de la población o diferente exposición a genotoxinas, ya que además se ha referido un comportamiento diferencial según zonas geográficas en las alteraciones citogenéticas encontradas en las neoplasias hematológicas (Rojas y col., 2000).

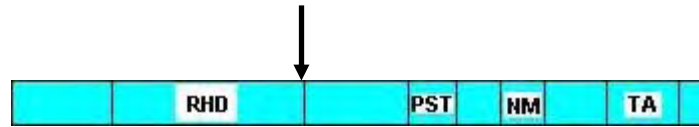
La t(8;21) fue clonada molecularmente en 1991 y mostró el rearreglo del gen *AML1* (referido también como *CBFA2*, *RUNX1*, *PEBP2αB* o *CBFα*) en el cromosoma 21 y el gen *ETO* (referido también como *MTG8* o *CDR*) en el cromosoma 8 (Downing, 1999), generando el gen quimérico *AML1/ETO* (Mrózek, 2001). *AML1* codifica una proteína nuclear de 250 aminoácidos (Andrieu y col., 1996) que corresponde a una subunidad del complejo *AML1/CBFβ*, un factor de transcripción de unión al núcleo. El complejo *AML1/CBFβ* actúa como un activador transcripcional crítico para la expresión específica de tejido de varios genes involucrados en la hematopoyesis. *ETO* codifica una fosfoproteína nuclear, homóloga a *nervy* de *Drosophila melanogaster* (Andrieu y col., 1996); su estructura sugiere que su función sea probablemente la de un regulador transcripcional (Downing, 1999).

AML1 (Fig.2) es expresado en células mieloides y *ETO* (Fig.3) es expresado normalmente en el cerebro, testículos y ovarios pero no en el linaje mieloide (Andrieu y col., 1996).

AML1/ETO genera una proteína quimérica (Fig.4) que inhibe la diferenciación de los progenitores mieloides suprimiendo genes implicados en este proceso. Sin embargo, por sí solo no induce la LMA, se requieren otros eventos genéticos adicionales (Nishida y col., 2006).

La generación de *AML1/ETO*, producto de la t(8;21), no sólo es diagnóstica de LMA M2 sino también, se ha asociado con un relativo buen pronóstico (Andrieu y col., 1996; Rosline y col., 2004) cuando es comparado con pacientes con otras formas de LMA (incluyendo el subtipo M2).

FIGURA 2: PROTEÍNA AML1



Fuente: Downing, J. (1999)

RHD: Runt homology DNA-binding domain

PST: Proline/serine/threonine-rich region

NM: Nuclear matrix attachment sequence

TA: Transcriptional activation domain

Organización de la proteína AML1. La flecha indica el lugar de corte en *AML1* para la formar de la proteína quimérica AML1/ETO

FIGURA 3: PROTEÍNA ETO



Fuente: Downing, J.(1999)

TAF: Transcription-activating factor

HHR: Hydrophobic heptad repeat

NHR3: Nery Homology región 3

Zn-F: Zn-finger motif

Organización de la proteína ETO. La flecha indica el lugar de corte en *ETO* para la formar de la proteína quimérica AML1/ETO

FIGURA 4: PROTEÍNA QUIMÉRICA AML1/ETO



Fuente: Downing, J.(1999)

Organización de la proteína quimérica AML1/ETO. La flecha indica el lugar de fusión de *AML1* y *ETO*

Otra alteración cromosómica común, adicional a la t(8;21) en la misma clona, es la pérdida del cromosoma sexual. Proporcionalmente hay más casos de LMA M2 en varones con t(8;21) con pérdida del cromosoma Y que varones con t(8;21) que retienen el cromosoma Y. La incidencia de la pérdida del cromosoma X es común en mujeres pero significativamente menos común que la pérdida sexual del cromosoma Y en varones. Casi el 20% de los casos de t(8;21) con pérdida del cromosoma X ó Y, pueden tener cambios cariotipos adicionales como delección del brazo largo del cromosoma 9 (del(9q)), observado en casi el 40% (sobre el 10% de todos los M2).

Cuando además de la presencia de la t(8;21), se adicionan otras alteraciones como la pérdida del cromosoma sexual o la delección del brazo largo del cromosoma 9, se asume un curso más agresivo de la LMA, así, la progresión de la leucemia parece estar asociado con la progresión cariotípica.

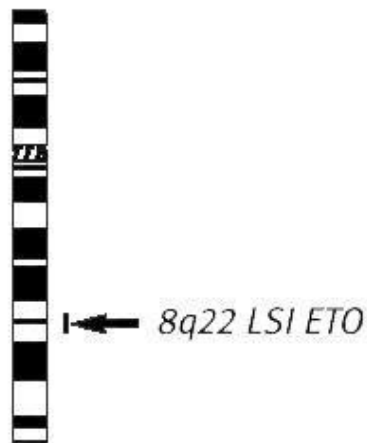
Variantes de la t(8;21), en la cual un tercer cromosoma está involucrado, ocurren en un porcentaje relativamente pequeño de casos (menos del 5% de LMA M2 y menos del 10% de todos los casos de LMA con t(8;21)). Esas translocaciones variantes involucran diferentes cromosomas que incluyen el 1, 2, 8, 11 y otros. Estos rearrreglos generalmente involucran a 8q22, 21q22 y una tercera banda; otras involucran 8q22 pero no 21q22; ó 21q22 pero no 8q22 (Sandberg, 1999). Estas translocaciones complejas que involucran tres cromosomas, indican que el cromosoma derivado del 8, el cual codifica la proteína de fusión AML1/ETO, es una lesión genética crítica en la enfermedad (Downing, 1999).

Otras alteraciones citogenéticas encontradas en LMA M2 son: monosomía del cromosoma 7 (-7), trisomía del 8 (+8), del(5q) y, mucho menos frecuente son: del(7q), monosomía del 5 (-5), del(3), inversión del cromosoma 3 (inv(3)), t(6;8) y t(7;11) (Heim y col., 1995)

El uso de la citogenética clásica o convencional, es aun una técnica de elección para la detección de anomalías cromosómicas, debido a su sencillez y robustez, ya que permite examinar, en un solo ensayo, el genoma entero de células individuales a nivel cromosómico (Teixeira, 2002). Sin embargo desde los años 80, se viene usando la técnica de FISH, la cual se

basa en la hibridización de una sonda marcada con una sustancia fluorescente, sobre su secuencia complementaria en el genoma (Figs.5 y 6). Aunque la técnica FISH todavía no se ha incorporado en todos los laboratorios de genética como rutina, la alta sensibilidad y especificidad y la rapidez de los ensayos, han hecho de esta técnica una importante estrategia diagnóstica con numerosas aplicaciones (Calasanz, 2001), entre ellas, la detección de genes quiméricos como *AML1/ETO*. Así, se han descrito casos de pacientes *AML1/ETO* positivos sin la t(8;21) por análisis de la citogenética clásica (Andrieu y col., 1996).

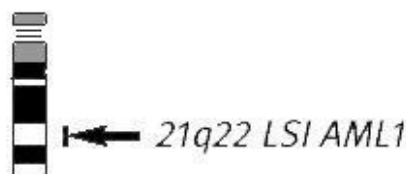
FIGURA 5: CROMOSOMA 8



Fuente: <http://www.vysis.com>

Idiograma del patrón de bandas G del cromosoma 8, indicando el lugar de hibridización de la sonda *LSI ETO*

FIGURA 6: CROMOSOMA 21



Fuente: <http://www.vysis.com>

Idiograma del patrón de bandas G del cromosoma 21, indicando el lugar de hibridización de la sonda *LSI AML1*

Durante casi 3 décadas se ha utilizado el sistema FAB para clasificar las LMA, y bajo este esquema se han asociado alteraciones citogenéticas recurrentes que afectan las vías de maduración y proliferación mieloide (Vardiman y col., 2002). Sin embargo, una determinada alteración cromosómica no es específica para un subtipo de LMA. Así, la t(8;21), también puede encontrarse en LMA M1. De modo inverso, no todas las LMA M2 presentan la t(8;21), ya que pueden estar presentes otros tipos de rearrreglos cromosómicos, e incluso cariotipos normales que podrían sugerir la presencia de rearrreglos a nivel génico, no detectables a nivel cromosómico. Asimismo, algunos hallazgos morfológicos e de inmunofenotipo pueden ser indicativo de la presencia de una alteración cromosómica. Blastos positivos para la t(8;21), muestran características morfológicas e inmunofenotípicas típicas. Frecuentemente expresan CD19, CD56 y CD34; en contraste CD2 y CD7 se expresan raramente. Su morfología es típica: blastos grandes con abundante citoplasma, numerosos gránulos, presencia de bastones de Auer y vacuolas citoplásmicas (Andrieu y col., 1996).

En la siguiente investigación se plantea determinar la frecuencia de la t(8;21), y de otras alteraciones cromosómicas, en pacientes adultos con diagnóstico de LMA M2, utilizando la técnica GTG; y determinar la concordancia entre estos resultados con los obtenidos por morfología e inmunofenotipo.

Dada la importancia de la detección de la t(8;21) en el pronóstico, y la posibilidad de no obtener metafases adecuadas para el análisis citogenético convencional, el uso de la técnica FISH se ha usado en la detección de *AML1/ETO* en algunos de esos casos y también en algunos cultivos con crecimiento, para que sus resultados se usen para compararlos con los obtenidos mediante la citogenética convencional.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

Muestras biológicas

Las muestras de médula ósea fueron extraídas en la Unidad de Procedimientos Especiales del INEN. Bajo condiciones de asepsia, se tomó un volumen total de 8 mL de médula ósea por paciente, del cual, 2 mL fueron tomados en un tubo vacutainer con EDTA y enviados al Laboratorio de Citometría de Flujo para el análisis del inmunofenotipo; 3 ml al Laboratorio de Hematología Especial, para el análisis morfológico y, 3 mL fueron colectados con una jeringa heparinizada (5000 UI, 0.2 mL) e inmediatamente enviados a la Unidad del Genética y Biología Molecular para el análisis citogenético convencional y/o molecular.

Revisión de Historias Clínicas

Se revisaron las historias clínicas de todos los pacientes adultos, procedentes del Departamento de Medicina*, admitidos entre enero del 2004 y diciembre del 2005, con diagnóstico de LMA. Se eligieron 43 pacientes con diagnóstico de LMA M2 que no recibieron tratamiento quimioterapéutico antes de la toma de muestra. Sólo 28 casos fueron cultivados, dependiendo si el médico tratante solicitaba el estudio o la disponibilidad del paciente para acceder a él.

Reactivos

Reactivos usados en la siembra

Medio de Cultivo Marrow Max Gibco™ Alcohol etílico 96º

• El Departamento de Medicina del INEN admitió pacientes desde los 15 años de edad.

Reactivos usados en la cosecha

KaryoMAX® Colcemid® *Gibco*™ KCl Metanol Q.P.
Acido acético glacial

Reactivos usados en la preparación y análisis de las láminas

Aceite de inmersión *Leica* n =1,518 Eosina-Azur-azul de metileno
Tripsina *Gibco*™ EDTA NaCl PBS Glicerol
Sonda *LSI AML1/ETO* Dual color Dual fusion NP-40 DAPI

Equipos y materiales

Equipos

Cabina de flujo laminar clase II *Labconco*®
Microscopio *Leica* DMLS con objetivo 100X
Microscopio trinocular de Fluorescencia *Leica* con el programa
Karyo (versión 1.4) y FISH (versión Y 1.3.1) y objetivo de 100X
Lámpara *Ulix* (luz roja) Vortex *Barnstead/Thermolyne* Maxi Mix II
Minicentrífuga *Labnet* Termociclador *Mj Research* PTC-200
Incubadora *Lab-line* Centrífuga Heraeus Baño María *Memmert*
Estufa *Geoimpex* Cronómetro *Hanhart* Balanza *Ohaus*

Materiales de laboratorio

Frascos de Cultivo 50 cc Jeringas de 10 cc Campos estériles
Guantes descartables Mascarillas Pizetas Probetas Koplins
Pipetas descartables de 3mL Láminas portaobjeto
Laminillas cubreobjeto Pinza fina Lápiz punta de diamante
Tubos de centrifugación de 15 mL
Tubos de centrifugación *ependorf* de 2mL

2. MÉTODOS

Siembra

Para cada procedimiento de siembra, utilizar la cámara de flujo laminar, irradiando todos los materiales necesarios bajo luz UV por 10 minutos, excepto las muestras y el medio de cultivo.

El medio de cultivo debe ser previamente incubado en baño María a 37°C por 5-10 minutos.

Sembrar las muestras de médula ósea en un frasco de cultivo conteniendo 5 mL de medio Marrow Max Gibco™. Agregar entre 15-20 gotas de médula ósea, dependiendo del conteo leucocitario referencial en sangre periférica. Dejar incubar 24 horas en la incubadora (5% CO₂, 37°C).

Cosecha

Homogenizar el contenido del frasco de cultivo, agregar 0.05 mL de KaryoMAX®Colcemid®Gibco™ 10ug/mL y dejar reposar 20 minutos a 37°C. Trasvasar el contenido del frasco de cultivo a un tubo de 15 mL. Centrifugar a 1000 rpm por 10 minutos. Eliminar el sobrenadante y homogenizar el precipitado. Agregar 10 mL de solución KCl al 0.56 g% a 37°C. Dejar incubar en baño maría a 37°C por 18 minutos. Agregar 1mL de fijador (metanol: ácido acético, 3:1), homogenizar y centrifugar a 1000 rpm por 10 minutos. Eliminar el sobrenadante y homogenizar el precipitado. Agregar 10 mL de fijador, homogenizar y dejar reposar 20 minutos a temperatura ambiente. Realizar de 2-3 lavados sucesivos con fijador.

Preparación de láminas

Homogenizar la muestra fijada y extender 2 gotas sobre cada lámina portaobjeto previamente limpiada con alcohol. Dejar secar y luego envejecer por 2 días en una estufa a 65°C. Preparar 4 láminas

en promedio, por caso, dependiendo de la cantidad de metafases analizables encontradas por lámina.

Técnica de bandeo cromosómico (Citogenética convencional)

Las láminas envejecidas someterlas a la técnica GTG, de acuerdo al siguiente procedimiento: 10 segundos en NaCl 0.9 g%, 10 segundos en tripsina 0.1 g% (en NaCl 0.9 g%) pH 8, 10 segundos en EDTA 2 g% y 2 lavados en PBS pH 7.4 10mM. Todo este procedimiento se realiza en baño maría a 37°C. Después colorear con la solución de colorante Eosina-Azur-Azul de metileno (Giemsa) por 3 minutos.

Técnica de FISH locus específico (Citogenética molecular)

Previamente, preparar solución buffer 2X SSC pH 7, de la siguiente manera:

Cloruro de Sodio 17.53 g, Citrato de sodio 8.82 g
c.s.p 1 L de solución. Ajustar el pH a 7 ± 0.2

Ubicar las zonas en las láminas donde se encuentran la mayor cantidad de metafases y/o núcleos al microscopio de campo claro, utilizando la lente condensadora para observar los cromosomas sin colorearlos. Las láminas se lavan en 2X SSC a 37°C por 5 minutos, luego se deshidratan en soluciones de alcohol a 70°, 85° y 100°, 2 minutos en cada una y luego se dejan secar. Se agrega a cada lámina 10 uL solución de la sonda, se cubre con una lámina cubreobjeto, los bordes se sellan con pegamento y se dejan en el termociclador por 20 horas (a 73°C por 2 minutos, luego a 37°C por 20 horas).

Luego se retira el pegamento con una pinza. Se coloca la lámina en la solución de 2X SSC 0,1% de NP-40 a temperatura ambiente procurando retirar la laminilla. Después, colocar las láminas por 2 minutos en la solución de 0.4X SSC 0.3% NP-40 en baño maría

a 73°C y luego 1 minuto en la solución de 2X SSC 0.1% NP-40 a temperatura ambiente y luego dejar secar.

Finalmente, se agrega 8 uL de DAPI 125 ng/mL, a cada lámina, se cubren con una laminilla y sellan con pegamento.

Análisis de láminas

Citogenética convencional

Se analizan en el microscopio, a un aumento total de 1000X, 20 ó más metafases por caso, cuando sea posible. Para elaborar el cariotipo, usar el microscopio trinocular *Leica* con el programa CW4000 Karyo versión 1.4, el cual permite capturar imágenes de las metafases y almacenarlas en formato electrónico. La nomenclatura para los cariotipos se realiza de acuerdo a los criterios del ISCN 2005.

Citogenética molecular

Las metafases se analizan mediante la observación con el microscopio de Fluorescencia. Se analiza como mínimo 20 metafases y/o 100 núcleos por caso.

El análisis de las láminas mediante la Citogenética molecular (FISH), se realiza después de 1 día de culminado el proceso, usando el microscopio de Fluorescencia visualizando con los filtros DAPI, green (para *AML1*) y red (para *ETO*). Las imágenes se superponen y analizan, utilizando el software Leica CW4000 FISH versión Y 1.3.1. Se identifican las señales presentes de cada fluorocromo, por núcleo o metafase.

Análisis de resultados

En la Unidad de Genética y Biología Molecular, los resultados pueden presentarse como cariotipo con Bandas G ó mediante el análisis por FISH locus específico. Los Laboratorios de Citometría de

Flujo y de Hematología Especial dan un resultado en conjunto acerca del inmunofenotipo y morfología, respectivamente.

En este estudio, para evaluar la concordancia existente entre los resultados de la citogenética convencional y los del inmunofenotipo y morfología, se aplica el índice de concordancia Kappa (K), el cual indica el grado de concordancia entre una variable y otra, dando un valor de 1 a la máxima concordancia y de 0 cuando la concordancia es igual a la esperada por el azar.

Para el procesamiento de los datos, se considera lo siguiente:

X_1 = Resultados por citogenética

Categorías:

1. Presencia de la translocación t(8;21)
2. Otros resultados

X_2 = Resultados por morfología e inmunofenotipo

Categorías:

1. Diagnóstico de LMA subtipo M2
2. Otros resultados

El índice de concordancia Kappa se calculó de la siguiente manera:

$$K = \frac{Po - Pe}{1 - Pe}$$

Donde:

Po = Proporción observada

Pe = Proporción esperada

RESULTADOS

De los 43 pacientes admitidos durante los años 2004 y 2005, diagnosticados como LMA M2 (FAB), 28 fueron cultivados para el análisis citogenético convencional. El 71% (20/28) de éstos fueron analizables y el 29% restante no por presentar metafases con cromosomas con mala morfología o porque sus cultivos no crecieron (Tabla 1 y 2).

De los 20 casos, en los que se obtuvieron metafases analizables, 30% (6/20) presentaron cariotipos normales (Figs.7 y 8), 45% (9/20) presentaron la t(8;21) ó sus variantes (5 varones y 4 mujeres) (Tabla 3 y Figs. 9-15). En un grupo de ellos se encontró adicionalmente, en una misma clona, otras alteraciones que incluyen: pérdida del cromosoma sexual (Figs.10-13), del(2p) (Fig.12), del(9q) (Fig.13) o presencia de cromosomas marcadores (Fig.14). El mayor porcentaje de pacientes con la t(8;21) y pérdida del cromosoma sexual, son varones.

Los casos que no presentaron la t(8;21) presentaron otras alteraciones numéricas o estructurales como hiperdiploidías (Fig.17), hipodiploidías o presencia de cromosomas marcadores (Fig.16).

Sólo a un grupo de 11 pacientes con el diagnóstico de LMA M2, se les realizó el análisis citogenético molecular mediante la técnica FISH locus específico, encontrándose 5 casos positivos y 6 negativos (Figs.13 y 14). Uno de los casos positivos representa una variante de la t(8;21), supuesto inicialmente como una t(1;21;8) mediante la citogenética convencional y, corroborada con la citogenética molecular (Fig.20).

Para determinar la concordancia de los datos obtenidos por la citogenética y la morfología e inmunofenotipo se levantó la siguiente tabla:

		X ₂		TOTAL
		LMA M2	Otros resultados	
X ₁	t(8;21)	7	1	8
	Otros resultados	9	3	12
TOTAL		16	4	20

X₁= Resultados por Citogenética

X₂= Resultados por morfología e inmunofenotipo

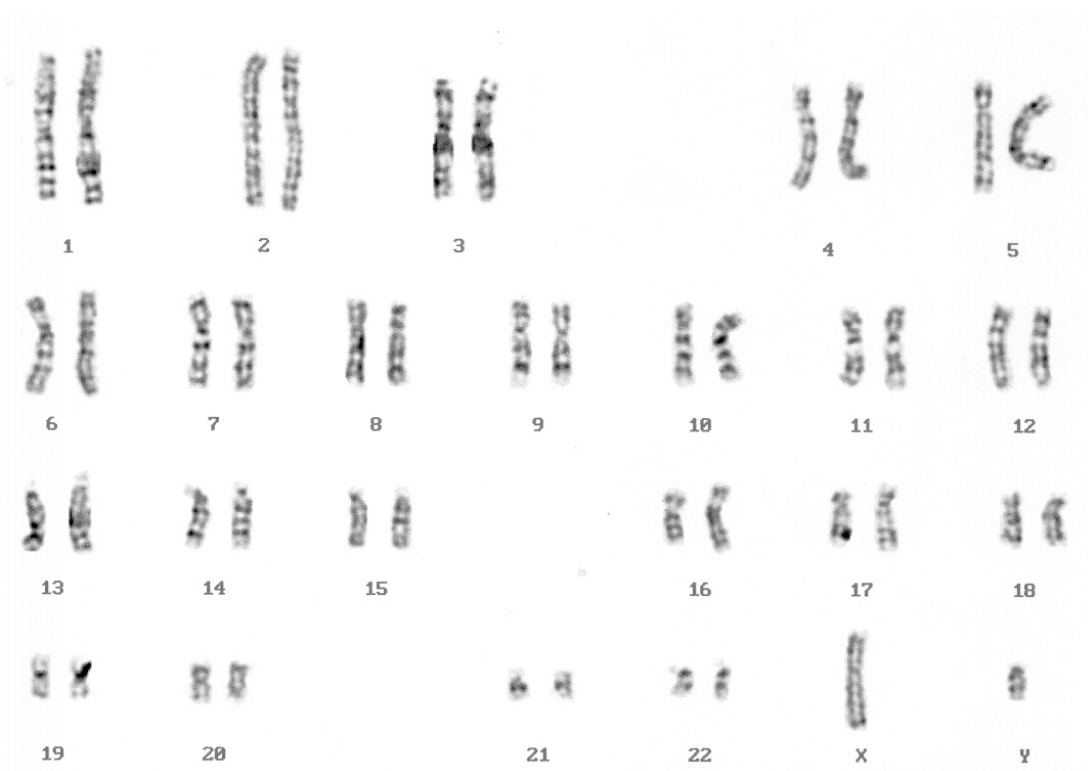
$$K = \frac{P_o - P_e}{1 - P_e}$$

$$P_o = \frac{3 + 8}{20} = 0.55$$

$$P_e = \frac{(11)(4) + (16)(9)}{20^2} = 0.47$$

El índice de concordancia Kappa obtenido fue de 0.151, indicando una concordancia insignificante (Error estándar = 0.162, sin asumir la hipótesis nula K = 0).

FIGURA 7: PACIENTE VARÓN QUE PRESENTA CARIOTIPO NORMAL
(C. 18)

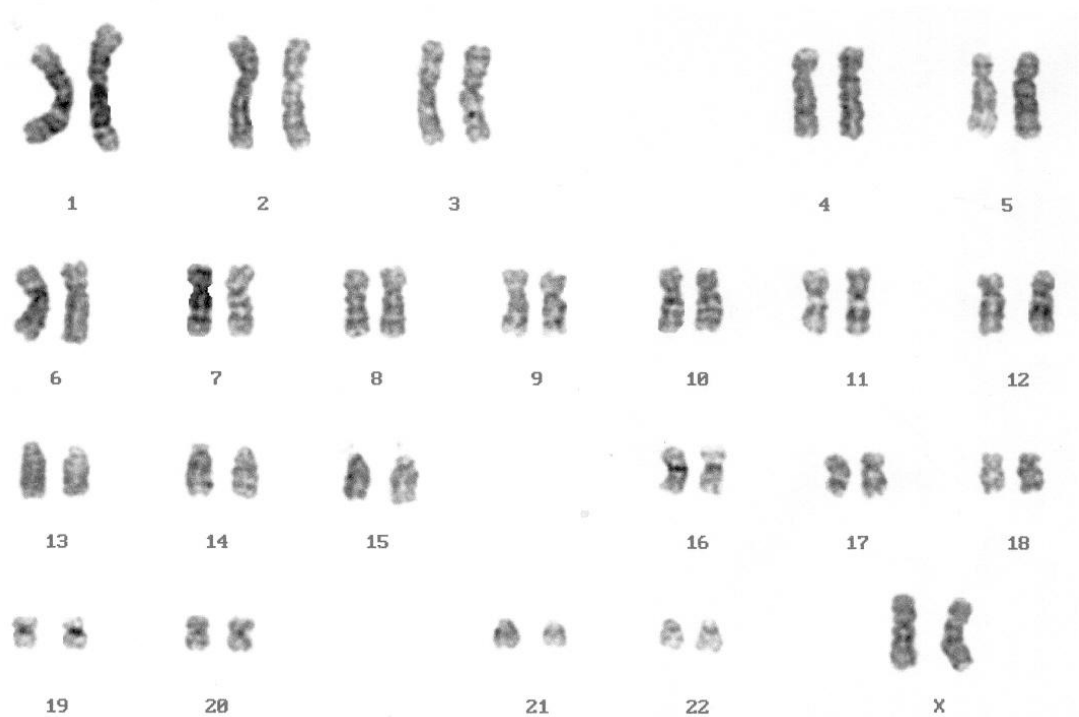


RESOLUCIÓN APROXIMADA 300-400 BANDAS (ISCN 2005)

46, XY

NOMENCLATURA DE ACUERDO AL ISCN 2005

FIGURA 8: PACIENTE MUJER QUE PRESENTA CARIOTIPO NORMAL
(C. 35)

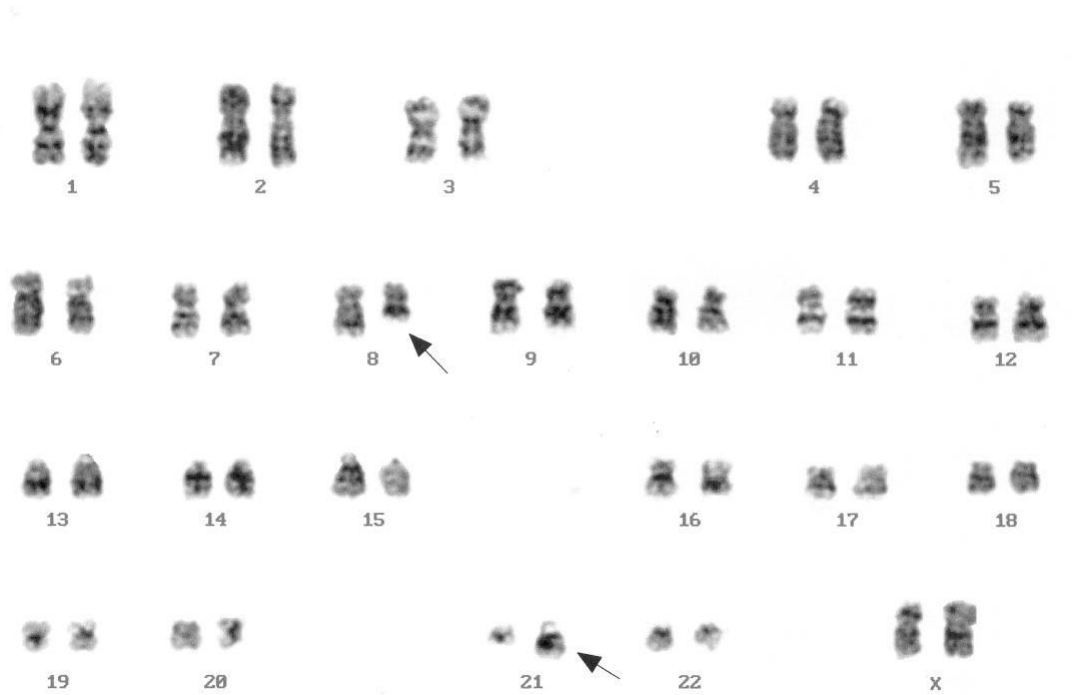


RESOLUCIÓN APROXIMADA 300 BANDAS (ISCN 2005)

46, XX

NOMENCLATURA DE ACUERDO AL ISCN 2005

FIGURA 9: PACIENTE MUJER QUE PRESENTA LA t(8;21)
(C. 42)

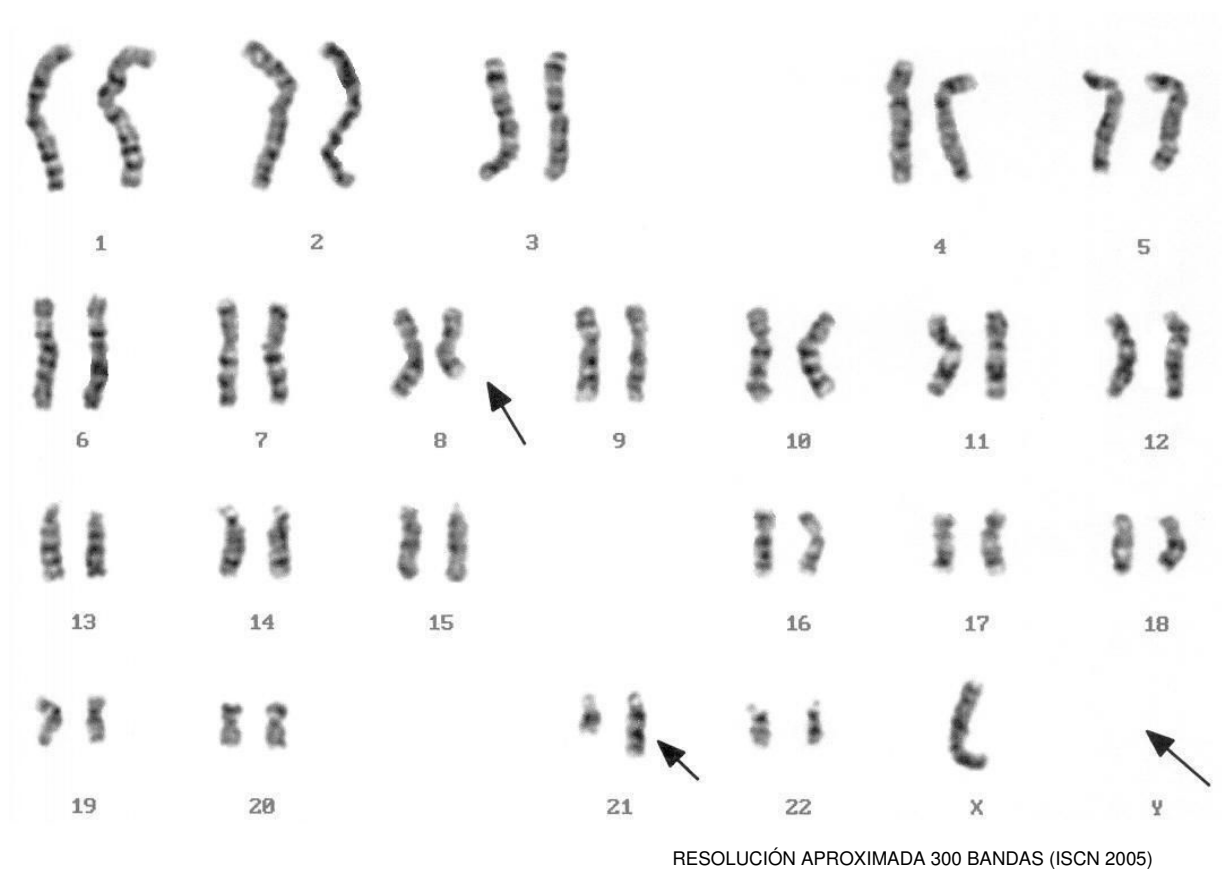


RESOLUCIÓN APROXIMADA 300 BANDAS (ISCN 2005)

46, XX,t(8;21)(q22;q22)

NOMENCLATURA DE ACUERDO AL ISCN 2005

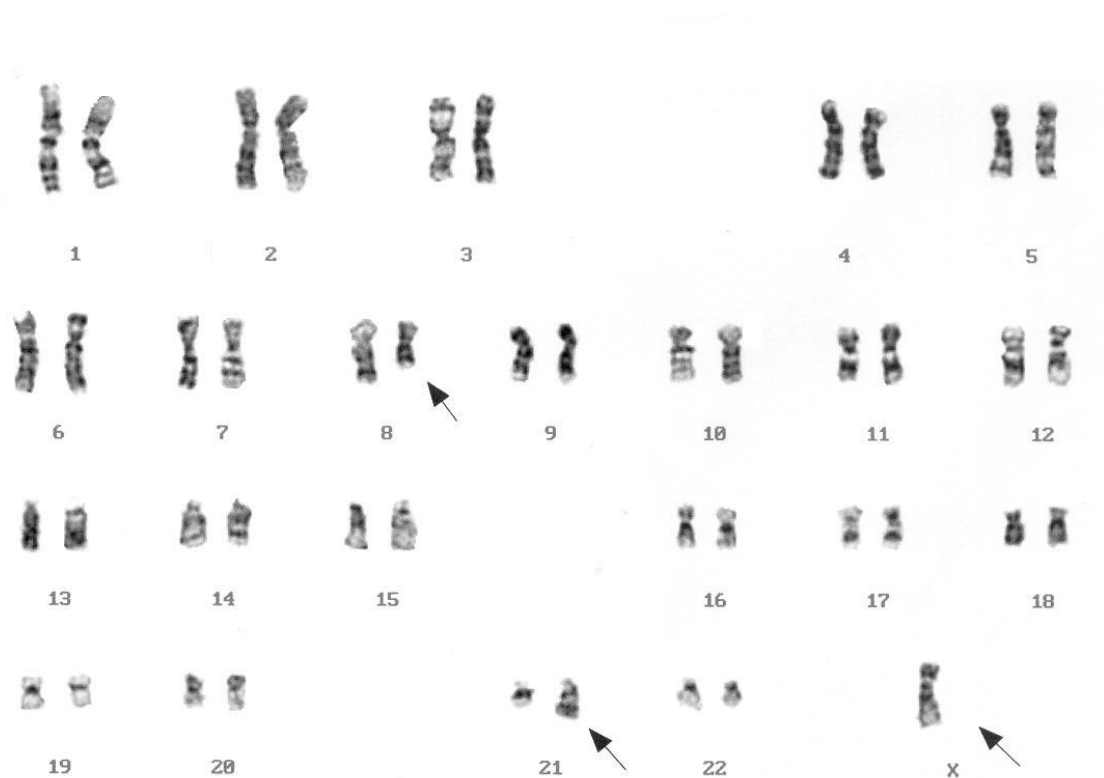
FIGURA 10: PACIENTE VARÓN QUE PRESENTA LA t(8;21) Y PÉRDIDA
DEL CROMOSOMA SEXUAL
(C. 24)



45, X,-Y,t(8;21)(q22;q22)

NOMENCLATURA DE ACUERDO AL ISCN 2005

FIGURA 11: PACIENTE MUJER QUE PRESENTA LA t(8;21) Y PÉRDIDA
DEL CROMOSOMA SEXUAL
(C. 43)

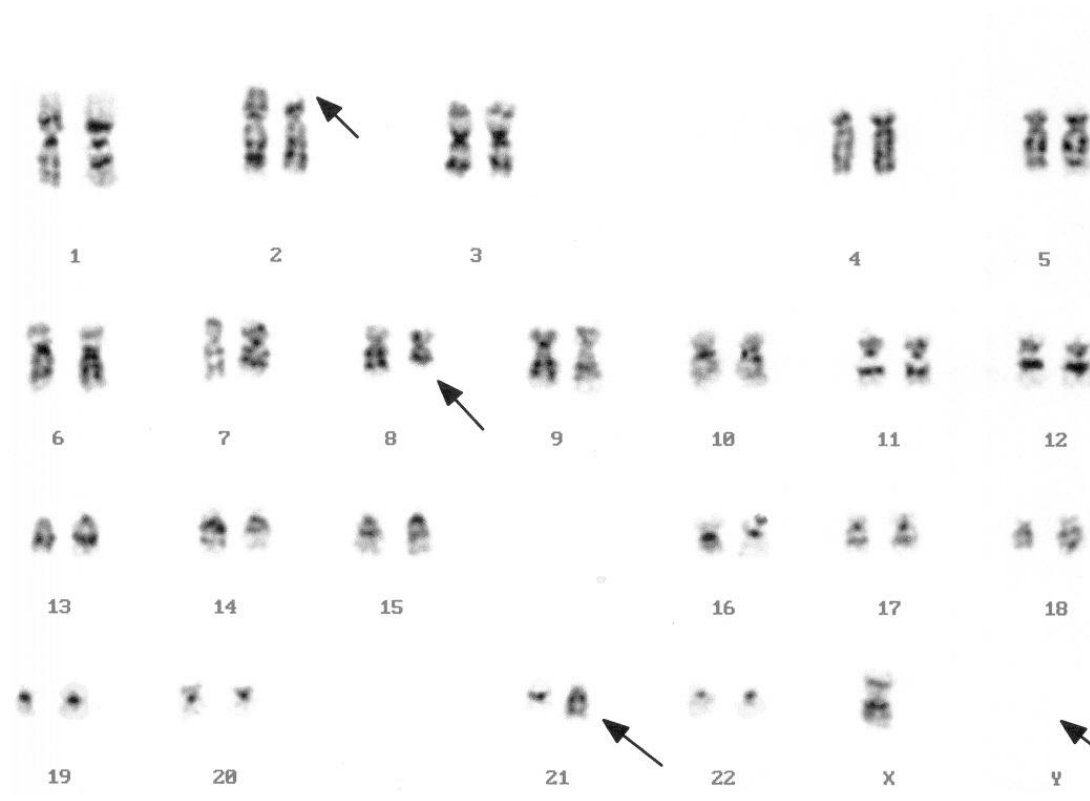


RESOLUCIÓN APROXIMADA 300 BANDAS (ISCN 2005)

45, X,-X,t(8;21)(q22;q22)

NOMENCLATURA DE ACUERDO AL ISCN 2005

FIGURA 12: PACIENTE VARÓN QUE PRESENTA LA t(8;21), PÉRDIDA
DEL CROMOSOMA SEXUAL Y DELECIÓN DEL BRAZO CORTO DEL
CROMOSOMA 2
(C. 20)

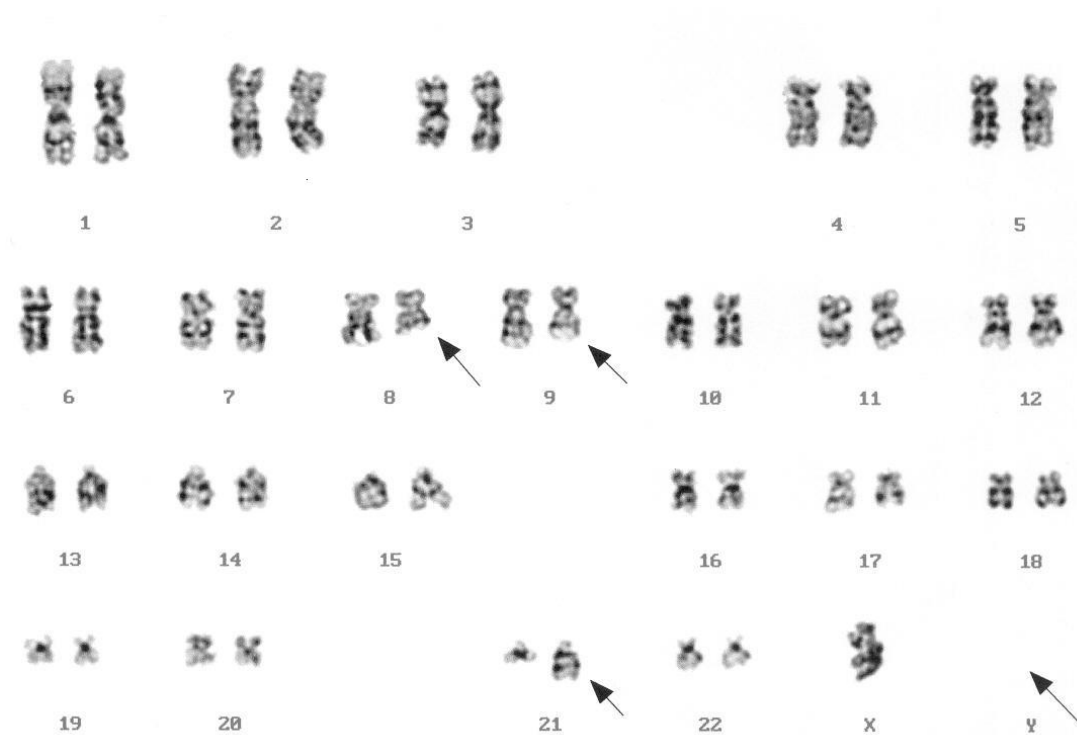


RESOLUCIÓN APROXIMADA 300 BANDAS (ISCN 2005)

45, X,-Y,del(2)(p22),t(8;21)(q22;q22)

NOMENCLATURA DE ACUERDO AL ISCN 2005

FIGURA 13: PACIENTE VARÓN QUE PRESENTA LA t(8;21), PÉRDIDA DEL CROMOSOMA SEXUAL Y DELECIÓN DEL BRAZO LARGO DEL CROMOSOMA 9
(C. 37)

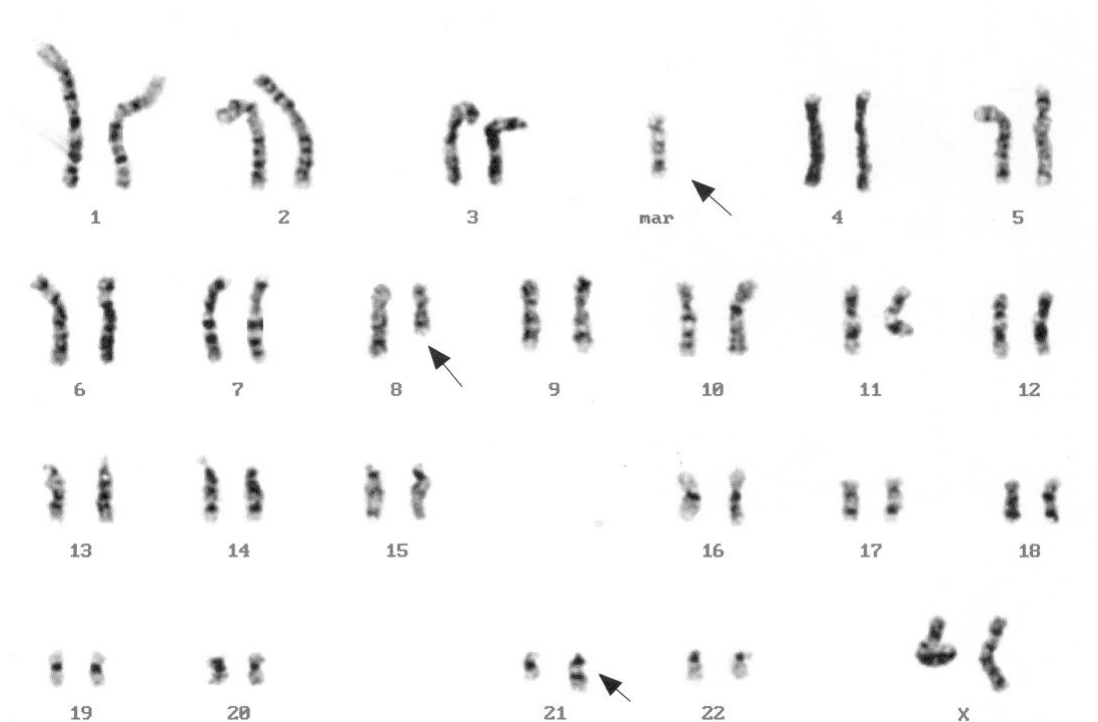


RESOLUCIÓN APROXIMADA 300 BANDAS (ISCN 2005)

45, X,-Y,t(8;21)(q22;q22),del(9)(q13;q22)

NOMENCLATURA DE ACUERDO AL ISCN 2005

FIGURA 14: PACIENTE MUJER QUE PRESENTA LA t(8;21) Y UN
CROMOSOMA MARCADOR
(C. 42)

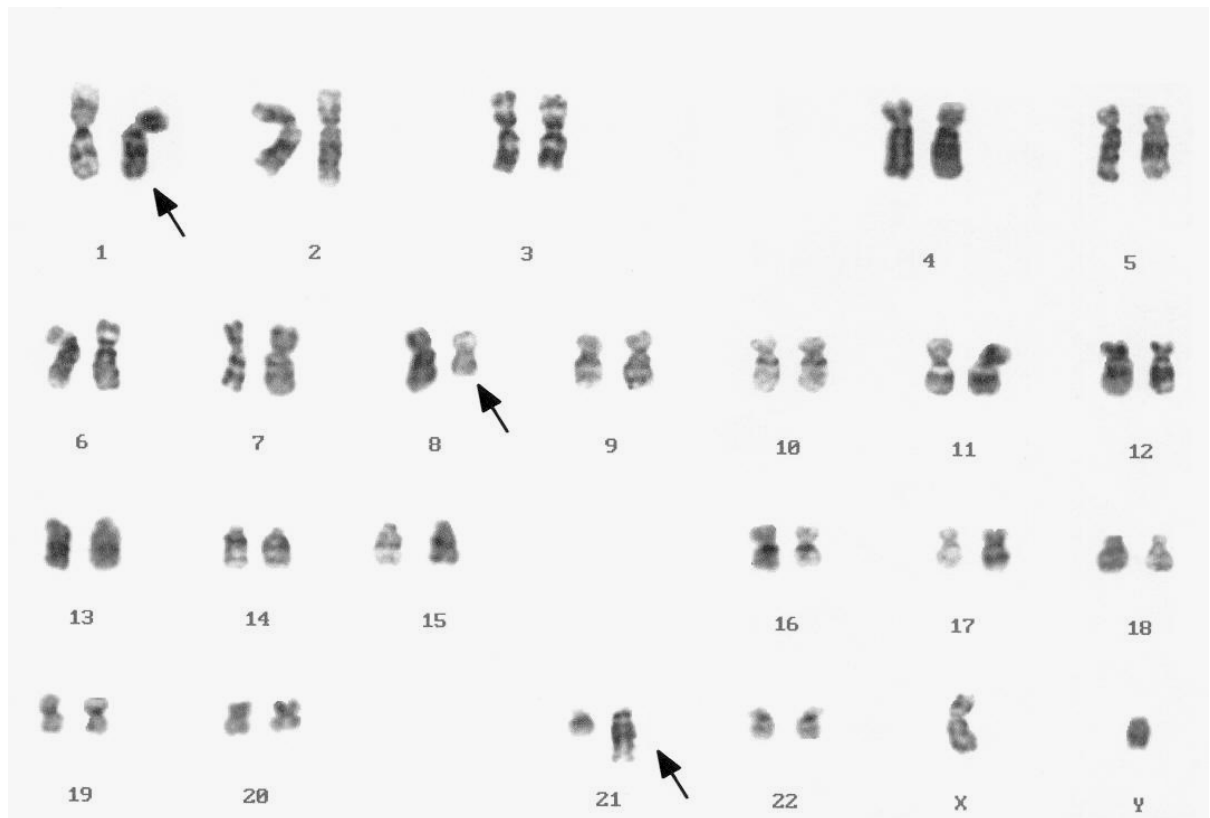


RESOLUCIÓN APROXIMADA 300 BANDAS (ISCN 2005)

47, XX,t(8;21)(q22;q22),+mar

NOMENCLATURA DE ACUERDO AL ISCN 2005

FIGURA 15: PACIENTE VARÓN QUE PRESENTA LA t(1;21;8)
(C. 23)

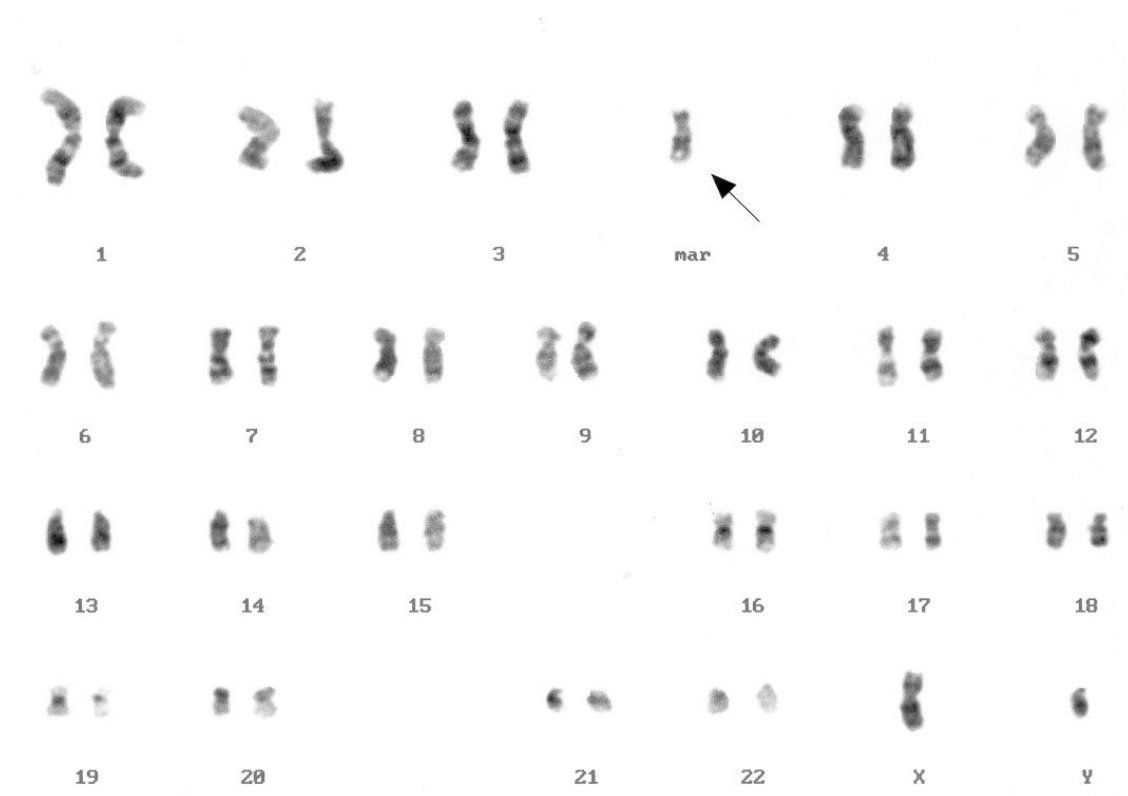


RESOLUCIÓN APROXIMADA 300 BANDAS (ISCN 2005)

46,XY,t(1;21;8)(p13;q22;q22)

NOMENCLATURA DE ACUERDO AL ISCN 2005

FIGURA 16: PACIENTE VARÓN QUE PRESENTA UN CROMOSOMA
MARCADOR
(C. 39)

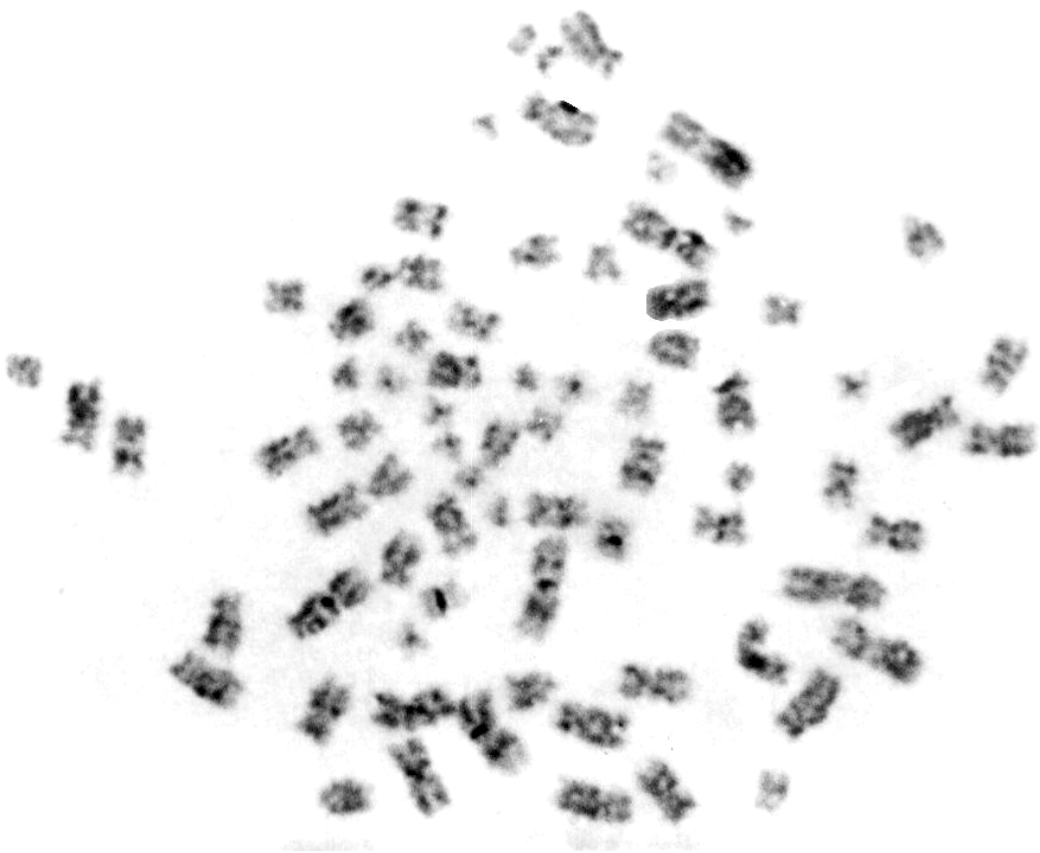


RESOLUCIÓN APROXIMADA 300 BANDAS (ISCN 2005)

47,XY,+mar

NOMENCLATURA DE ACUERDO AL ISCN 2005

FIGURA 17: PACIENTE VARÓN QUE PRESENTA HIPERDIPLOIDÍAS
(C. 3)

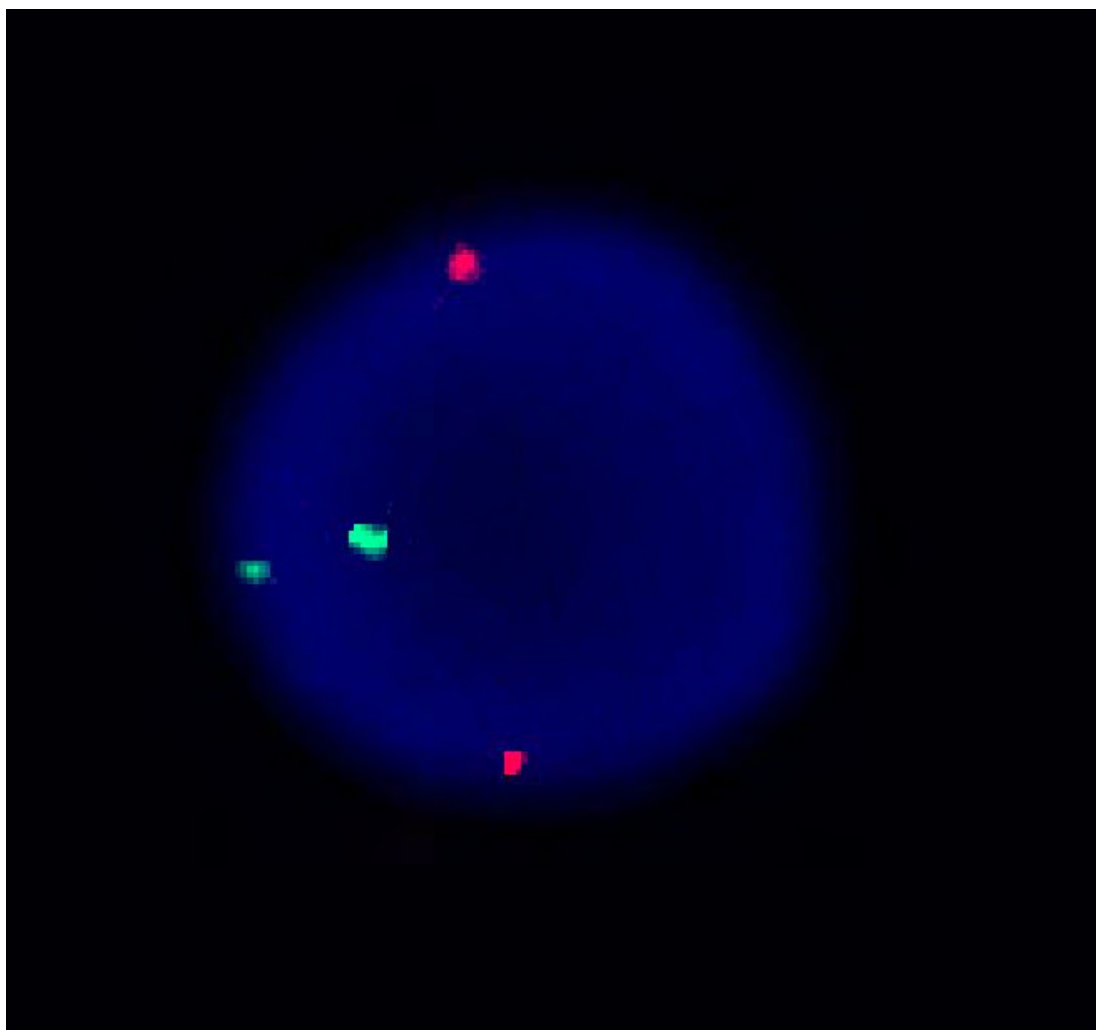


RESOLUCIÓN APROXIMADA 300 BANDAS (ISCN 2005)

Metafase hiperdiploide que presenta 75 cromosomas

FIGURA 18: PACIENTE NEGATIVO PARA EL GEN DE FUSIÓN *AML1/ETO*
MEDIANTE FISH LOCUS ESPECÍFICO

(C. 28)



1000X

nuc ish (AML1,ETO)x2

NOMENCLATURA DE ACUERDO AL ISCN 2005

Sonda green (Señal verde): gen *AML1*

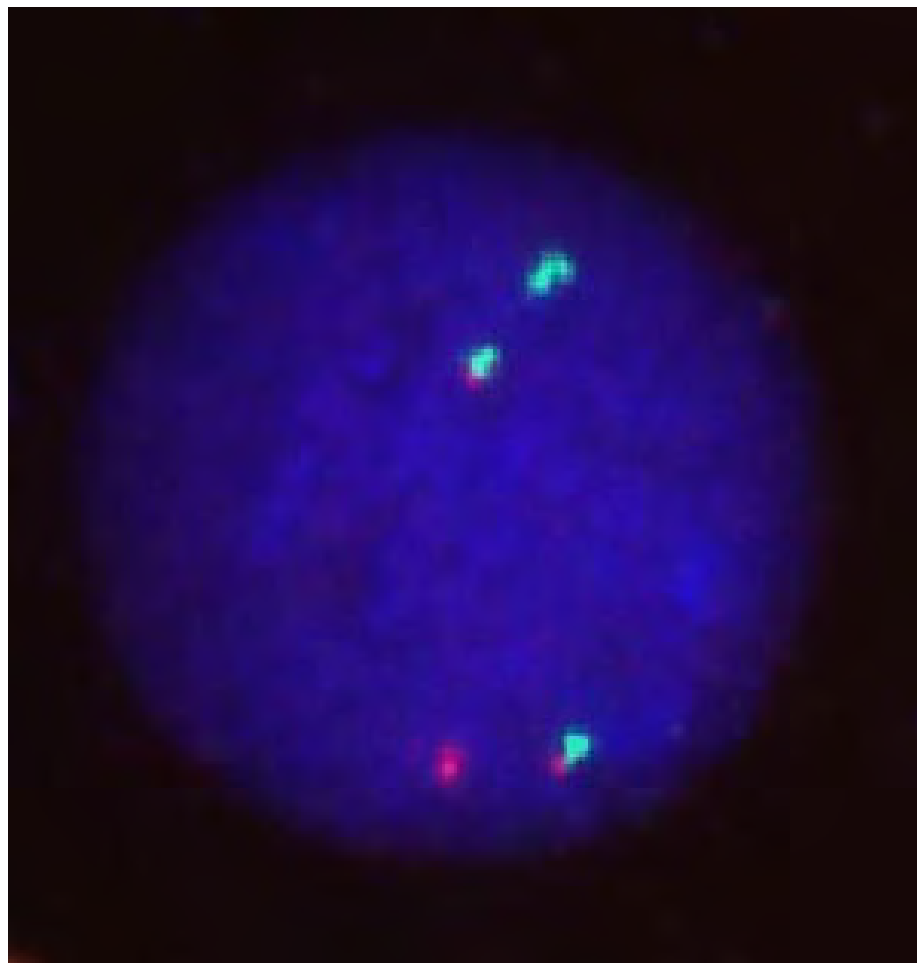


Sonda red (Señal roja): gen *ETO*



FIGURA 19: PACIENTE POSITIVO PARA EL GEN DE FUSIÓN *AML1/ETO*
MEDIANTE FISH LOCUS ESPECÍFICO

(C. 36)



1000X

nuc ish (*AML1*x3),(*ETO*x3),(*AML1* con *ETO*x2)

NOMENCLATURA DE ACUERDO AL ISCN 2005

Sonda green (Señal verde): gen *AML1*



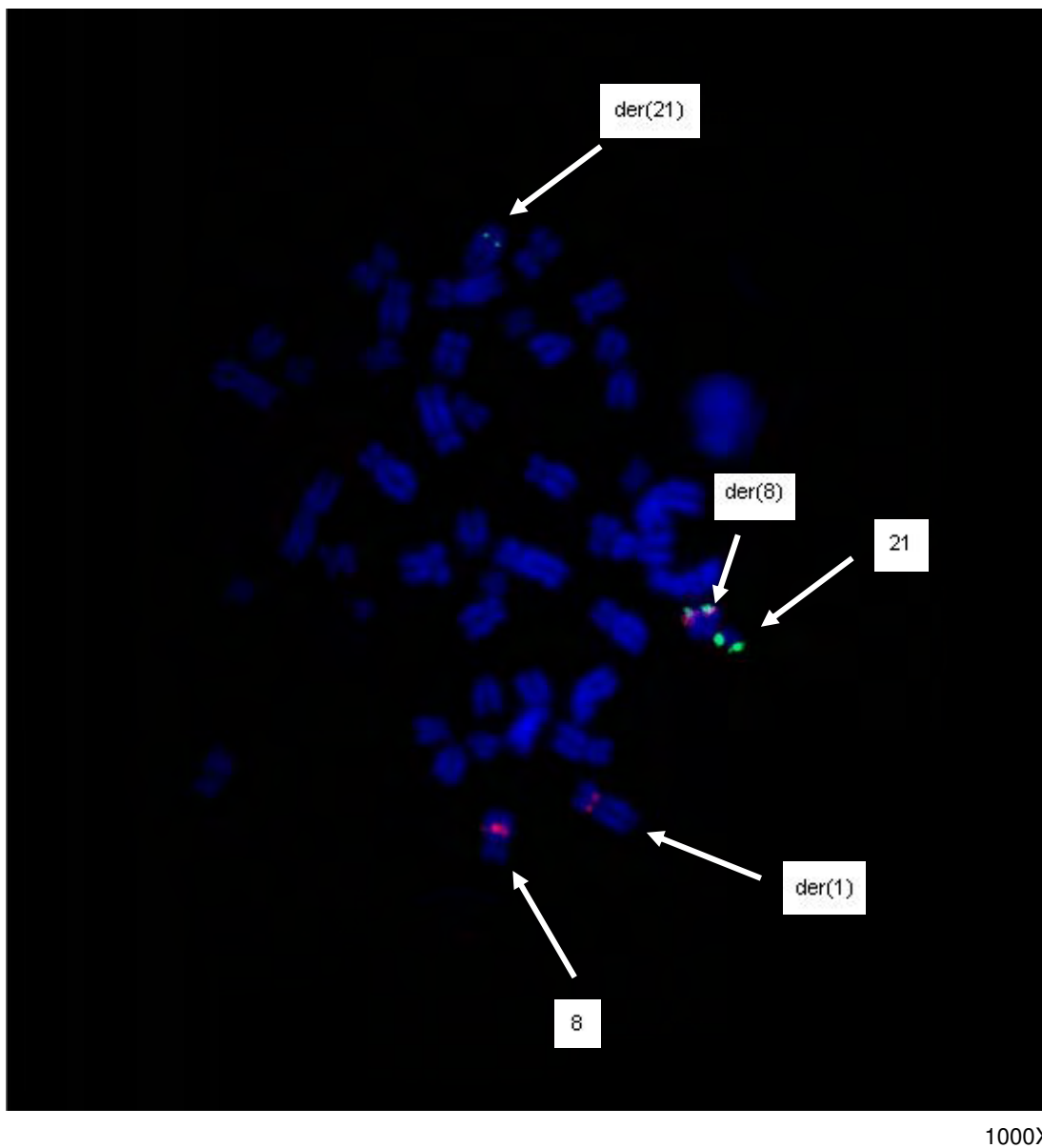
Sonda red (Señal roja): gen *ETO*



Señal de fusión: *AML1/ETO*



FIGURA 20: PACIENTE POSITIVO PARA LA $t(1;21;8)$ MEDIANTE FISH
 LOCUS ESPECÍFICO QUE INVOLUCRA LOS GENES *AML1* Y *ETO*
 (C. 23)



46,XY, $t(1;21;8)(p13;q22;q22).ish\ t(1;21;8)(ETO+; AML1+; ETO+1,AML+)$

NOMENCLATURA DE ACUERDO AL ISCN 2005

Sonda green (Señal verde): gen *AML1*



Sonda red (Señal roja): gen *ETO*



Señal de fusión: *AML1/ETO*



TABLA 1

C	E	S	CITOGENETICA CONVENCIONAL	CM	MORFOLOGIA E INMUNOFENOTIPO	DX FINAL
1	27	M	46, XY [38]/Hiperdiploidías (75~78 cromosomas) [5]	-	LMA M2	LMA M2
2	40	F	-	-	LMA M2	LMA M2
3	58	M	Hiperdiploidías (75 cromosomas) [18]/Hiperdiploidías (80 ~ 190 cromosomas) [15]	-	LMA M2	LMA M2
4	20	M	46,XY	-	LMA M2	LMA M2
5	48	M	-	-	LMA confirmar DE	LMA M2
6	16	M	46,XY [10]/43~45, XY, t(8;21)(q22;q22) [3]	-	LMA M2 vs LMA PT	LMA M2
7	18	M	-	-	LMA M2	LMA M2
8	54	M	-	-	LMA M2	LMA M2
9	30	F	-	-	LMA M2 vs LMA PT	LMA M2
10	21	M	-	-	LMA M2	LMA M2
11	16	F	46, XX	-	LMA M2 vs LMA PT	LMA M2
12	15	F	46,XX	-	LMA M2	LMA M2
13	16	M	Hipodiploidías (40 ~ 45 cromosomas)	-	LMA M2	LMA M2
14	59	F	46, XX, t(8;21)(q22;q22) [3]/Hiperdiploidías (76 ~ 89 cromosomas)[13]	-	LMA M2	LMA M2
15	57	F	-	-	LMA M2	LMA M2
16	22	F	-	-	LMA M2	LMA M2
17	21	M	-	-	LMA M2	LMA M2
18	20	M	46, XY [20]/ Hiperdiploidías [3]	-	LMA M2	LMA M2
19	17	M	Metáfases con cromosomas de mala morfología	-	LMA M2	LMA M2
20	15	M	45,X,-Y, del(2)(p22),t(8;21)(q22;q22)	-	LMA M2	LMA M2
21	47	M	-	-	-	LMA M2
22	23	M	-	-	LMA M2	LMA M2
23	63	M	46,XY, t(1;21;8)(p13;q22;q22)	P	LMA M2	LMA M2
24	21	M	46, XY, t(8;21)(q22;q22) [4]/45,X,-Y,t(8;21)(q22;q22)[13]	-	LMA M2	LMA M2
25	38	M	Metáfases con cromosomas con mala morfología	-	LMA M2	LMA M2
26	18	M	Metáfases con cromosomas con mala morfología	-	LMA M2	LMA M2
27	31	M	Metáfases con cromosomas con mala morfología	-	LMA M2	LMA M2
28	21	F	Metáfases con cromosomas con mala morfología	N	LMA	LMA M2
29	31	F	46,XX	-	LA	LMA M2
30	69	M	-	-	LMA M2	LMA M2
31	54	F	Metáfases con cromosomas con mala morfología	-	LMA M2	LMA M2
32	56	F	No crecimiento	N	LMA M2	LMA M2
33	35	F	Metáfases con cromosomas con mala morfología	-	LMA M2	LMA M2
34	48	M	-	-	LMA M2	LMA M2
35	16	F	46,XX	-	LMA M2 D/C LMA M2 PT	LMA M2
36	30	F	45,X,-X, t(8;21)(q22;q22)	P	LMA M2	LMA M2
37	28	M	45,X,-Y,t(8;21)(q22;q22),del(9)(q13;q22)	P	LMA M2	LMA M2
38	22	F	46,XX	N	LMA M2	LMA M2
39	37	M	47,XY,+mar	N	LMA M2	LMA M2
40	30	M	-	N	LMA M2	LMA M2
41	29	M	-	N	LMA M2	LMA M2
42	16	F	46,XX,t(8;21)(q22;q22)[7]/47,XX,t(8;21)(q22;q22),+mar [2]	P	LMA M2	LMA M2
43	41	F	45,X,-X,t(8;21)(q22;q22)	P	LMA M2	LMA M2

CM: Citogenética Molecular

C: Código de caso

DE: Doble estirpe

DX: Diagnóstico

E: Edad

N: Negativo

PT: Parcialmente tratada

P: Positivo

S: Sexo

TABLA 2

RESULTADOS DE LOS CULTIVOS DE MÉDULA ÓSEA

	CASOS	PORCENTAJE
CARIOTIPO ANALIZABLE	20	71
METAFASES CON CROMOSOMAS DE MALA MORFOLOGÍA	7	25
NO CRECIMIENTO	1	4
TOTAL	28	100

TABLA 3

**ALTERACIONES CROMÓSÓMICAS
(POR CITOGENÉTICA CONVENCIONAL)**

	CASOS	PORCENTAJE
t(8;21)*	9	45
OTRAS ALTERACIONES (NUMÉRICAS Ó ESTRUCTURALES)	5	25
CARIOTIPO NORMAL	6	30
TOTAL	20	100

*t(8;21) o variantes.

TABLA 4

t(8;21)* DE ACUERDO A SEXO

	t(8;21)*	PORCENTAJE
VARON	5	55.6
MUJER	4	44.4
TOTAL	9	100

TABLA 5

t(8;21)* DE ACUERDO A EDAD

EDAD (años)	RANGO DE EDAD	CASOS	PORCENTAJE
<56	15-41	7	77.8
>56	59-63	2	22.2
TOTAL		9	100

TABLA 6

t(8;21)* COMO ANOMALÍA ÚNICA O CON ALTERACIONES ADICIONALES EN LA MISMA CLONA

	CASOS	PORCENTAJE	CASOS/ TOTAL DE CASOS	PORCENTAJE
t(8;21)*	3	33.3	3/20	15
t(8;21)* Y ANOMALÍAS ADICIONALES	6	66.7	6/20	30
TOTAL	9	100	9/20	

TABLA 7

t(8;21)* CON PÉRDIDA DEL CROMOSOMA SEXUAL ADICIONAL EN LA MISMA CLONA

	CASOS	PORCENTAJE
t(8;21) * Y PÉRDIDA DE CROMOSOMA SEXUAL ADICIONAL	4	25
OTROS RESULTADOS	15	75
TOTAL	20	100

TABLA 8

CASOS ANALIZABLES POR CITOGÉNÉTICA CONVENCIONAL Y MOLECULAR

		CASOS	PORCENTAJE
CITOGÉNÉTICA CONVENCIONAL	CON RESULTADO	20	71
	SIN RESULTADO	8	29
TOTAL		28	
CITOGÉNÉTICA MOLECULAR	CON RESULTADO	11	100
	SIN RESULTADO	0	0
TOTAL		11	

TABLA 9

C	SANGRE				MÉDULA							CITOGENÉTICA	
					BLASTOS (%)	MARCADORES DE INMUNOFENOTIPO						t(8;21)	GEN DE FUSIÓN AML1/ETO
	HEMOGLOBINA (g/L)	LEUCOCITOS X10 ⁹ /L	BLASTOS (%)	LDH U/L		CD7	CD13	CD19	CD 34	CD56	HLA-DR		
1	69	244.8	21	-	26		Parcial		Parcial	Parcial	Parcial	-	
2	44	5.9	82	462	71								
3	45	3.3	0	-	43	Parcial	+		+	Parcial	+	-	
4	81	7.9	5	629	25							-	
5	30	183	70	1293	84								
6	107	14.7	26	1820	26	-	+	-	+	-	+	+	
7	75	69.5	81	4788	53	-	+	-	+	+	+		
8	27	5.9	45	-	67								
9	79	1.2	0	-	35								
10	63	10.9	35	-	36								
11	69	1.3	0	324	57			-	+	Parcial	-	-	
12	7	6.7	33	1120	64	Parcial			+	Parcial	+	-	
13	57	16.7	0	-	36	-	+		+	+	+	-	
14	82	9.1	54	8830	64	-	+	Parcial	+	+	+	+	
15	102	16.3	51	-	64								
16	63	5.3	55	-	75								
17	47	18.7	48	798	68								
18	67	64	8	6052	30							-	
19	86	133	30	4470	45		Parcial		+	Parcial	+	ND	
20	91	15.2	52	1376	33	-	+		+	+	+	+	
21	64	10.9	55	1178	-								
22	76	17.3	62	799	0.3								
23	90	30	0	1402	52		+	Parcial	+	+	+	+	+
24	77	1.45	28	1916	45				+	+	+	+	
25	7.8	2.24	68	-	28	-	+	-		-	Parcial	ND	
26	53.4	4.2	41	2198	50		+		+			ND	
27	90	125.7	63	4111	52	-	+	-	+	-		ND	
28	97.3	10.9	0	-	57							ND	-
29	57	67.2	10	585	32							-	
30	89	8.8	62	-	72	-	+		+	-	+		
31	93	115.9	82	2675	78		+	-	-	+	-	ND	
32	8.9	177	83	-	85		+		Parcial		Parcial	ND	-
33	88.3	14	53	-	43		+				Parcial	ND	
34	94	26.4	53	-	34	-		-	Parcial	-	+		
35	91	9.4	75	885	55	-	+		+	-	+	-	
36	48	14.7	66	922	57	-	+	Parcial	+	Parcial	+	+	+
37	59	3.3	12	-	22		+	+	+	+		+	+
38	60.8	1.94	25	355	23	-	+			-	+	-	-
39	35	62.4	77	-	55	Parcial	+		+		+	-	-
40	39.6	99.8	0	1179	43	+	+		Parcial	-	+		-
41	53	26.3	77	5154	62	+	+	Mínimo	+	+	+		-
42	77	16.7	64	1267	39	-	+		+	+	+	+	+
43	67.5	152	95	2128	82		+	Parcial	+	+	+	+	+

C:Código de caso

ND: No es posible determinar

LDH: Lactato deshidrogenasa

HLA-DR: Antígeno leucocitario humano relacionado a D

DISCUSIÓN

De todos los pacientes admitidos durante los años 2004 y 2005, diagnosticados como LMA subtipo M2 (FAB), las muestras de 28 casos fueron cultivados para el análisis citogenético convencional. Esto dependía de la posibilidad de cada paciente a someterse a la prueba o si el médico tratante la solicitaba. En el 71% (20/28) de éstos, se lograron analizar las metafases, obtenidas luego del cultivo, tanto estructuralmente y/o numéricamente. Sólo un 29% (07/28) de ellos, no pudieron ser analizados ya que sus metafases presentaban cromosomas con mala morfología o sus cultivos no crecieron (Tabla 2). Este porcentaje de casos no analizables por citogenética convencional se acerca a lo sugerido para este método por otros autores como Arana-Trejo, 2002. La proporción de casos sin crecimiento se aproxima con lo esperado para las LMA, siendo este valor mucho más alto para las LLA.

De los casos analizables, 45% (9/20) presentaron la $t(8;21)$ ó sus variantes (Tabla 3 y Figs.9–15). La proporción de casos de LMA M2 con $t(8;21)$ varía dependiendo de la población (Rojas, 2000) e incluso de la técnica de cultivo y procesamiento de las muestras por el investigador para obtener metafases con cromosomas de buena calidad que permitan la detección de las alteraciones cromosómicas en las neoplasias hematológicas.

La mayor parte de casos con $t(8;21)$ (78%), se encontraban en un rango de edad de 15-49 años (Tabla 5), lo cual concuerda con estudios previos que afirman que los pacientes con esta alteración son generalmente jóvenes o adultos jóvenes (Andrieu y col., 1996). Adicionalmente, en el 25% de pacientes con la $t(8;21)$, se observó en la misma clona, pérdida del cromosoma sexual (Tabla 7 y Figs.10–13). La pérdida del cromosoma sexual ha sido reportada en una variedad de desórdenes hematológicos (Bakshi y col., 2004). Esta alteración podría ser secundaria, ya que se observó un caso con 2 clonas: una con la $t(8;21)$ y la otra con la $t(8;21)$ y pérdida del cromosoma sexual adicional. En otros casos se observó metafases con la $t(8;21)$, pérdida del cromosoma sexual y otras alteraciones adicionales en la

misma clona como la delección del cromosoma 9 (Fig.13) o un cromosoma marcador (Fig.16).

De las 11 muestras sometidas al análisis mediante la citogenética molecular, 100% mostraron un resultado. Esto demuestra que el uso de técnicas más sensibles y altamente específicas como el FISH brindan mayor efectividad en la obtención de un resultado (Tabla 8).

La técnica FISH permite evaluar la presencia o ausencia de una alteración supuesta. En este estudio se usó la sonda LSI *AML1/ETO* para la detección de la t(8;21), dando un resultado positivo o negativo, a pesar que el cultivo presente cromosomas con metafases con mala morfología o no hubiera crecimiento, porque se puede analizar incluso solamente. Sin embargo, esta técnica requiere la presunción de que alteración podría encontrarse (Teixeira, 2002) y no permite detectar otras alteraciones. Por lo tanto el análisis del cariotipo (citogenética convencional) es la técnica de elección para un tamizaje inicial en el diagnóstico de enfermedades hematológicas (Teixeira, 2002), pudiendo ser complementada por la técnica de FISH locus específico, aplicada en este trabajo en sólo algunos casos, debido al alto costo de los reactivos.

Un caso positivo para la t(8;21), mediante la citogenética convencional, incluyó una variante de la t(8;21), supuesta inicialmente como una t(1;21;8), anomalía cromosómica ya reportada (Taguchi y col., 1986), y que fue corroborada con la técnica FISH (Fig.20), indicando que esta técnica es útil en la verificación de rearrreglos específicos.

Las técnicas de citogenética convencional y molecular son una herramienta útil en el diagnóstico de las enfermedades hematológicas, además ayudan al pronóstico y seguimiento de los pacientes. Sin embargo, es necesario utilizar otras herramientas para el diagnóstico del paciente como son la morfología e inmunofenotipo, las cuales en este trabajo no reflejaron alcanzar una concordancia significativa (índice kappa = 0.151) entre sus resultados, comparados con los obtenidos por la citogenética convencional. Debe tenerse en cuenta que sólo los casos que presentaron la translocación t(8;21), se consideraron como 100% concordantes con los resultados proporcionados mediante el inmunofenotipo y morfología para LMA M2. La t(8;21) generalmente es asociada a la LMA M2, en la práctica

clínica. Sin embargo, en pacientes con este diagnóstico, pueden encontrarse otras alteraciones cromosómicas, e incluso cariotipos normales, lo cual podría involucrar una alteración o alteraciones a nivel génico no identificable mediante la citogenética convencional.

Los parámetros evaluados en el Laboratorio de Hematología Especial, se corresponden a lo esperado para las LMA M2, en los casos incluidos para este estudio, por ejemplo la blastosis medular que varía entre 30-90% (Romero y col., 2002).

El conteo leucocitario en todos ellos se encuentra entre $1.2 - 183 \times 10^9/L$. En pacientes mayores de 56 años de edad se observa que el conteo leucocitario varía entre $3.3 - 16.6 \times 10^9/L$, valores relativamente bajos, como lo señalado por Appelbahum y col., 2006. De igual modo, los valores de LDH son elevados, y varían entre a 324 - 8830 U/L. Estos parámetros, analizados en algunos estudios sobre leucemias, son indicadores de pronóstico.

Sin embargo, correlaciones morfológico-genéticas no siempre son perfectas, y los hallazgos genéticos pueden predecir el pronóstico y propiedades biológicas de las leucemias más consistentemente que la morfología (Vardiman y col., 2002).

Todos los pacientes que presentaron la $t(8;21)$ son positivos para CD13, CD34 y CD56, como lo señalado por Downing, 1999; además todos, excepto un caso no evaluado (C.37), son positivos para HLA-DR. Los casos evaluados para CD7 y CD19 resultaron negativos y positivos, respectivamente, aunque un caso (C.7) fue negativo para CD19. En general, puede afirmarse que, para este estudio, los marcadores de inmunofenotipo son concordantes con lo esperado para los pacientes con LMA M2 que presentan la $t(8;21)$.

CONCLUSIONES

1. Los cariotipos encontrados, son: cariotipo normal (46, XX ó 46, XY), cariotipos con alteraciones citogenéticas, principalmente con la t(8;21).
2. La alteración cromosómica principal en los pacientes adultos con diagnóstico de LMA M2 (FAB), del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas, es la t(8;21), observados mediante la citogenética convencional, en el 45% de casos. El 25% de ellos presentaron adicionalmente pérdida del cromosoma sexual.
3. Pueden encontrarse translocaciones variantes de la t(8;21), en bajo porcentaje de casos. En este estudio se encontró la t(1;21,8) donde participan 3 cromosomas (cromosomas 1, 21 y 8).
4. La técnica del FISH permitió evaluar la presencia de la t(8;21) en muestras de médula ósea de pacientes adultos con diagnóstico de LMA M2, tanto en metafase como interfase.
5. La cantidad de casos con resultados, ya sean positivos o negativos, aumenta si se utiliza la técnica FISH adicionalmente al cariotipo.

RECOMENDACIONES

1. El análisis cromosómico convencional por medio del cariotipo, se sugiere como técnica de elección inicial para la detección de anormalidades cromosómicas, pudiendo ser complementada con técnicas citogenéticas moleculares como FISH.
2. Se recomienda utilizar la técnica FISH en aquellos casos de cultivos que no presentan metafases (no crecimiento), bajo índice mitótico, casos con metafases cuyos cromosomas presentan mala morfología, que no permiten el análisis mediante la citogenética convencional.
3. Para una mejor comparación de los resultados mediante técnicas de citogenética convencional y molecular, es preferible someter a todas las muestras a ambos procedimientos.
4. En general, los cultivos de pacientes con leucemias mieloides agudas, presentan un alto índice de crecimiento, sin embargo, en algunos casos, como un bajo conteo leucocitario, se sugiere hacer dos cultivos por paciente, para aumentar la probabilidad de obtener metafases para el análisis citogenético.
5. Se recomienda analizar por separado, cada característica morfológica y de inmunofenotipo, comparándolos con los hallazgos citogenéticos para obtener relaciones entre la presencia de un carácter con una anomalía cromosómica; de igual modo, evaluarlos de acuerdo a su relación con el pronóstico, haciendo un seguimiento de la evolución del paciente.

BIBLIOGRAFÍA

1. Acevedo, A. Patología de la médula ósea. Editorial El Ateneo 1993. Buenos Aires.
2. Appelbahum, F.; Gundacker, H.; Head, D.; Slovak, M.; Willman, C.; Godwin, J.; Anderson, J. and Petersdorf, S. Age and acute myeloid leukemia. Blood 2006 Vol 107(9):3481-3485 (ABSTRACT).
3. Anastasi, J.; Vardiman, J.; Rudinsky, R.; Patel, M.; Nachman, J.; Rubin, C. and Le Beau, M. Direct correlation of cytogenetic findings with cell morphology using in situ hybridization: an analysis of suspicious cells in bone marrow specimens of two patients completing therapy for acute lymphoblastic leukemia. Blood 1991 Vol 77(11):2456–2462.
4. Andrieu, V.; Radford-Weiss, I.; Troussard, X.; Chane, C.; Valensi, F.; Guesnu, M.; Haddad, E.; Viguiet, F.; Dreyfus, F.; Varet, B.; Flandrin, G. and Macintyre, E. Molecular detection of t(8;21)/AML1-ETO in AML M1/M2: correlation with cytogenetics, morphology and immunophenotype. British Journal of Haematology 1996 92:855-865.
5. Arana-Trejo, AM. Biología Molecular y FISH: utilidad en el estudio de las leucemias agudas. Temas Selectos del Laboratorio de hematología. Gaceta Médica de México. Vol 138 Supl 1 Marzo-Abril 2002.
6. Bakshi, S.; Kakafia, P.; Brahmbhatt, M.; Trivedi, P.; Rawal, S.; Bhatt, S.; Parikh, B.; Patel, K.; Shukla, S and Shah, P. Loss of sex chromosome in acute myeloid leukemia. Indian Journal of Human Genetics 2004 January-June Vol 10 Issue 1.
7. Berger, R.; Bernheim, A.; Daniel, M.; Valensi, F.; Sigaux, V. and Faldrin, G. Cytologic characterization and significance of normal karyotypes in t(8;21) acute myeloblastic leukemia. Blood 1982 Vol 59 N°1.

8. Brunning, R. and McKenna, R. Tumors of de bone marrow. Atlas of Tumor Pathology. *Ad Visory Board*. 1994. Third Series. Fascicle 9. Armed Forces Institute of Pathology.
9. Calasanz, M.J. Revisión de técnicas de citogenética convencional y molecular y su implicación en el diagnóstico y pronóstico del cáncer. *Anales Sis San Navarra* 2000 Vol 24 Supl 1.
10. Cho, EK; Bang, SM; Ahn, JY; Yoo, SM; Park, PW; Seo, YH; Shin, DB and Lee, JH. Pronostic value of AML1/ETO fusion transcripts in patients with acute myelogenous leukemia. *Korean J Intern Med* 2003 Mar 18(1):13-20.
11. Downing, J. The AML1-ETO chimaeric transcription factor in acute myeloid leukaemia: biology and clinical significance. *British Journal of Haematology* 1999 106 296-308.
12. Gilliland, D. Molecular genetics of human leukemias: new insigths into therapy. *Seminars in hematology* 2002 Vol 39 N° 4 Suppl 3 (October) 6-11.
13. Heim, S. & Mitelman, F. Cancer cytogenetics. Chromosomal and Molecular Genetic Aberrations of tumor cells. *Wiley-Liss*. 1995. Second Edition.
14. ISCN 2005. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (2005). Recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature. Editors Lisa G. Shaffer and Niels Tommerup. S Karger AG.
15. Kaushal, S.; Sidhu, S.S.; Anand, N.; Patnaik, V.V.G. and Singla, Rajan K. A study of chromosomal morphology in leukemias. *J Anat Soc India* 2001 50(2) 112-118.

16.Lasa, A.; Nomdedéu, J., Carnicer, M.; Llorente, A. and Sierra, J. *ETO* sequence may be dispensable in some *AML1-ETO* leukemias. To the editor. Blood 1 December 2002 Vol 100 N° 12.

17.Mrózek, K.; Heinonen, K. and Bloomfield, C. Pronostic value of cytogenetic findings with acute myeloid leukemia. International Journal of Hematology 2000 Vol 72 261-271.

18.Mrózek, K.; Prior, T.; Edwards, C.; Marcucci, G.; Carroll, A.; Snyder, P.; Koduru, P.; Theil, K.; Pettenati, K.; archer, K.; Caligiuri, M.; Vardiman, J.; Kolitz, J.; Larson, R. and Bloomfield, C. Comparison of cytogenetic and molecular genetic detection of t(8;21) and inv(16) in a prospective series of adults with *de novo* acute myeloid leukemia: a cancer and leukemia group B study. Journal of Clinical Oncology 2001 Vol 19 N° 9 2482-2492.

19.Nishida, S.; Hosen, N.; Shirikata, T.; Kanato, K.; Yanagihara, M.; Nakatsuka, S.; Hoshida, Y.; Nakasawa, T.; Harada, Y.; Tatsumi, N.; Tsuboi, A.; Kawakami, M.; Oka, Y.; Oji, Y.; Aozasa, K.; Kawase, I. and Sugiyama, H. *AML1-ETO* rapidly induces acute myeloblastic leukemia in cooperation with the Wilms Tumor gene, *WT1*. Blood April 2006 Vol 107 N° 8 3303-3312 (ABSTRACT).

20.Rojas, A.; Pineda, L.; Gonzáles, S.; Soto, M.; Urdaneta, B.; Prieto-Carrasquero, M. Avila, E.; Gonzáles, R. Anomalías cromosómicas en enfermedades hematológicas malignas. Acta Científica Venezolana 2000 51:109-114.

21.Romero, A. y Jiménez, R.M. Leucemias agudas. Medicina de familia (And) 2002 Vol 3 N°1.

22.Rosline, H.; Narazah, M.; Illunihayati, I.; Isa, M. and Baba, A. The Detection of *AML1/ETO* Fusion Transcript in Acute Myeloid Leukaemia in Universiti Sains Malaysia Hospital. Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology 2004 Vol 12 49-52.

23. Sandberg, A. The chromosomes in human cancer and leukemia. Elsevier. 1990. Second Edition.
24. Staudt, L. Molecular diagnosis of the hematologic cancers. N Engl J Med 2003 348;18.
25. Taguchi, H.; Kitagawa, T.; Yamashita, M.; Kubonishi, I. and Miyoshi, I. New Variant Translocation (1;8;21) in a case of acute myeloblastic leukemia (M2). Cancer Genet Cytogenet 1986 23: 219-223.
26. Taub, J.; Huang, X.; Matherly, L.; Stout, M.; Buck, S.; Massey, G.; Becton, D.; Chang, M; Weinstein, H. and Ravindranath, Y. Expression of chromosome 21- Localized Genes in Acute Myeloid Leukemia: Differences Between Down Syndrome and Non-Down Syndrome Blast Cells and Relationship to *In Vitro* Sensitivity to Cytosine Arabinoside and Daunorubicin. Blood Vol 94 Nº 4 (August 15) 1999 1393-1400.
27. Teixeira, M. Combined classical and molecular cytogenetic analysis of cancer. European Journal of Cancer 2002 38:1580-1584.
28. Toogeh, G.; Najafi, A. H. and Keyhani, M. Cytogenetic findings in acute myeloid leukemia. Acta Médica Iránica 2003 Vol 41 Nº4.
29. Vardiman, J.; Lee, N. and Brunning, R. The World Health Organization (WHO) Classification of the myeloid neoplasm. Blood 2002 Vol 100 Nº 7.
30. Verschuur, A. Acute myeloblastic leukemia with maturation. Orphanet Encyclopedia 2004.
[Citado 01 Agosto 2006] <http://orpha.net/data/patho/GB/uk-AML2.pdf>
31. [Citado 14 Agosto 2006]. <http://atlasgeneticsoncology.org/Anomalies/t0821.html>